

Université de Montréal

**Rôle de la Topoisomérase I dans la stabilité du génome
chez *Escherichia coli***

Par

Christy Manuella Ngingone

Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures et postdoctorales

En vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès sciences

en Microbiologie et Immunologie

Décembre, 2013

© Christy Manuella Ngingone, 2013

Université de Montréal

Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

**Rôle de la Topoisomérase I dans la stabilité du génome
chez *Escherichia coli***

Présenté par :

Christy Manuella Ngingone

A été évalué par un jury composé des membres suivants :

France Daigle, président-rapporteur

Marc Drolet, directeur de recherche

George Szatmari, membre du jury

Mémoire accepté le :.....

Résumé :

Les topoisomérases (topos) de type IA jouent un rôle primordial dans le maintien et l'organisation du génome. Cependant, les mécanismes par lesquels elles contrôlent cette stabilité génomique sont encore à approfondir. Chez *E. coli*, les deux principales topoisomérases de type IA sont la topo I (codée par le gène *topA*) et la topo III (codée par le gène *topB*). Il a déjà été montré que les cellules dépourvues des topos I et III formaient de très longs filaments dans lesquels les chromosomes ne sont pas bien séparés. Comme ces défauts de ségrégation des chromosomes sont corrigés par l'inactivation de la protéine RecA qui est responsable de la recombinaison homologue, il a été émis comme hypothèse que les topoisomérases de type IA avaient un rôle dans la résolution des intermédiaires de recombinaison afin de permettre la séparation des chromosomes. D'autre part, des études réalisées dans notre laboratoire démontrent que le rôle majeur de la topoisomérase I est d'empêcher la formation des R-loops durant la transcription, surtout au niveau des opérons *rrn*. Ces R-loops ont été récemment identifiés comme des obstacles majeurs à l'avancement des fourches de réplication, ce qui peut provoquer une instabilité génomique. Nous avons des évidences génétiques montrant qu'il en serait de même chez nos mutants *topA*. Tout récemment, des études ont montré le rôle majeur de certaines hélicases dans le soutien aux fourches de réplication bloquées, mais aussi une aide afin de supprimer les R-loops. Chez *E. coli*, ces hélicases ont été identifiées et sont DinG, Rep et UvrD. Ces hélicases jouent un rôle dans la suppression de certains obstacles à la réplication. Le but de ce projet était de vérifier l'implication de ces hélicases chez le mutant *topA* en utilisant une approche génétique. Étonnamment, nos résultats montrent que la délétion de certains de ces gènes d'hélicases a pour effet de corriger plutôt que d'exacerber des phénotypes du mutants *topA* qui sont liés à la croissance et à la morphologie des nucléoides et des cellules. Ces résultats sont interprétés à la lumière de nouvelles fonctions attribuées aux topoisomérases de types IA dans la stabilité du génome.

Mots clés : Topoisomérases de type IA, R-loops, réplication, transcription, surenroulement de l'ADN, recombinaison homologue, collisions réplication-transcription, hélicases DinG, Rep et UvrD.

Abstract

Type IA topoisomerases (topos) play a vital role in the maintenance and organization of the genome. However, the mechanisms by which they control genome stability still remain to be explored. In *E. coli*, the two type IA topoisomerases are topo I (encoded by *topA*) and topo III (encoded by *topB*). It has been shown that cells lacking topo I and III form very long filaments in which the chromosomes are not well separated. As the chromosome segregation defects are corrected by inactivation of the RecA protein, that is responsible for homologous recombination, it has been hypothesized that type IA topoisomerases have a role in the resolution of recombination intermediates to allow chromosome segregation. On the other hand, studies in our laboratory have shown that the major role of topoisomerase I is to prevent the formation of R-loops during transcription, especially at the *rrn* operons. These R-loops have been recently identified as major roadblocks to the progression of replication forks, which can cause genomic instability. We have genetic evidence suggesting similar effects may occur in our *topA* mutants. More recently, studies have shown the important role of certain helicases in eliminating roadblocks for replication forks that could sometimes be R-loops. In *E. coli*, these helicases have been identified and they are DinG, Rep and UvrD. The purpose of this project was to study the roles of these helicases in our *topA* mutant, using a genetic approach. Surprisingly, our results show that deletions of some of these genes have the effect of correcting rather than exacerbating *topA* mutant phenotypes that are related to the growth and cell and nucleoid morphology. These results are interpreted in the light of new functions assigned to the type IA topoisomerases in genome stability.

Keywords: Topoisomerases type IA, R-loops, replication, transcription, DNA supercoiling, homologous recombination, transcription-replication collision, DinG, Rep and UvrD helicases.

TABLE DES MATIERES

Résumé.....	iv
Abstract.....	v
Table des matières.....	vi
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des abréviations.....	xii
Remerciements.....	xiv
1. Revue de littérature.....	1
1.1 Introduction.....	2
1.1.1 Structure de l'ADN.....	4
1.1.2 Le surenroulement de l'ADN.....	8
1.1.3 Les topoisomérases.....	14
1.1.3a Les topoisomérases de type IA.....	16
1.1.3a.1 La topoisomérase I.....	18
1.1.3a.2 La topoisomérase III.....	20
1.1.3b Les topoisomérases de types IIA.....	22
1.1.3b.1 La gyrase.....	23
1.1.3b.2 La topoisomérase IV.....	26
1.2 Contexte de la collision entre réplication et transcription.....	27
1.2.1 La topoisomérase I.....	27
1.2.2 Réplication de l'ADN.....	29
1.2.3 Transcription.....	30

1.2.4 R-loops.....	31
1.2.5 Arrêt des fourches de réplication : causes et conséquences.....	33
1.2.5.1 Cause et conséquence des fourches de réplication arrêtées au niveau de la recombinaison.....	34
1.2.5.2 Cause et conséquence des fourches de réplication arrêtées au niveau de la transcription et de la réplication.....	38
1.2.6 Contexte des hélicases.....	39
1.2.6.1 L'hélicase DinG.....	40
1.2.6.2 L'hélicase Rep.....	42
1.2.6.3 L'hélicase UvrD.....	44
1.2.6.4 Activité des hélicases sur les R-loops.....	46
1.2.6.5 Activité des hélicases sur l'ARN polymérase.....	47
1.3. Objectif du projet.....	49
2. Matériels et Méthodes.....	50
3. Résultats.....	63
4. Discussion.....	84
5. Conclusion et perspectives.....	91
6. Bibliographie.....	93
7. Annexe.....	101

LISTE DES TABLEAUX

Section 2 : Matériel et méthodes

Tableau 1 : Souches d'*E. coli* utilisées et construites pour ce projet.....50

Tableau 2 : Milieux de cultures et préparations utilisées.....54

LISTE DES FIGURES

Section 1. Revue de littérature

Figure 1 Représentation schématique des trois formes de la double hélice d'ADN.....6

Figure 2 Représentation des états de surenroulement de la double hélice d'ADN.....11

Figure 3 Représentation de l'action des topoisomérases de type I...17

Figure 4 Représentation de l'action des topoisomérases de type II...22

Figure 5 Recombinaison initiée par le système RecBCD.....35

Figure 6 Chargement de la protéine RecA par le système RecFOR ou RecO R.....36

Section 3. Résultats

Figure 7 Effet de l'inactivation de l'hélicase Rep sur la croissance du mutant *topA*.....65

Figure 8 Effet de l'inactivation de l'hélicase Rep sur la croissance du mutant *gyrB(Ts)*.....69

Figure 9 Effet de l'expression de la RNaseHI sur la croissance du double mutant $\Delta(topAcysB)204, \Delta rep-729$	70
Figure 10 Coloration au DAPI des cellules du double mutant $\Delta(topAcysB)204, \Delta rep-729$	71
Figure 11 Effet de l'absence de l'hélicase UvrD sur la croissance du mutant $\Delta(topAcysB)204$	75
Figure 12 Effet de l'inactivation de l'hélicase UvrD sur la croissance du mutant $gyrB203(Ts)$	76
Figure 13 Effet de l'expression de la RNaseHI sur la croissance du double mutant $\Delta(topAcysB)204, \Delta uvrD769$	77
Figure 14 Coloration au DAPI des cellules du double mutant $\Delta(topAcysB)204, \Delta uvrD769$	78
Figure 15 Effet de l'inactivation de l'hélicase DinG sur la croissance du mutant $\Delta(topAcysB)204$	81
Figure 16 Effet de l'expression de la RNaseHI sur la croissance du double mutant $\Delta(topAcysB)204, \Delta dinG771$	82
Figure 17 Colocation au DAPI des cellules du double mutant $\Delta(topAcysB)204, \Delta dinG771$	83

Section 7. Annexe

Figure 18 : PCR pour la vérification et la confirmation de l'inactivation du gène *rep* chez les doubles mutants $\Delta(topAcysB)204,\Delta rep-729$ et $gyrB203(Ts),\Delta rep-729$101

Figure 19 PCR pour la vérification et la confirmation de l'inactivation du gène *dinG* chez les doubles mutants $\Delta(topAcysB)204,\Delta dinG771$ et $gyrB203(Ts)\Delta dinG771$ 103

Figure 20 PCR pour la vérification et la confirmation de l'inactivation du gène *uvrD* chez le doubles mutant $\Delta(topAcysB)204,\Delta uvrD769$ 105

LISTE DES ABRÉVIATIONS

5', 3' : Extrémité 5 prime, extrémité 3 prime

A : Adénine

Å : Angstrom

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ADP : Adénosine diphosphate

ARN : Acide Ribonucléique

ATP : Adénosine triphosphate

ATPase : Adénosine triphosphatase

°C : Degré Celsius

C: Cytosine

E. coli: Escherichia coli

DAPI: 4', 6-diamidino-2-phénylindole

G: Guanine

HU: «Histone Like Protein»

Kb: Kilobase(s)

LB: Luria-Bertani

Lk: «Linking number»

mL: millilitre (s)

Mg²⁺ : Ion magnésium

nm : nanomètre (s)

oriC : Origine de réplication

pb : paire de base

***rnhA* : gène codant pour la RNaseHI**

RNase : Ribonucléase

***rrn* : ARN Ribosomal**

SF1 : Superfamille 1

SF2 : Superfamille 2

T : Thymine

Topo (s): topoisomérase (s)

***topA*: gène codant pour la topoisomérase I**

***topB*: gène codant pour la topoisomérase III**

Tw : «*twist*»

Wr: «*Writhe*»

REMERCIEMENTS:

Je souhaite d'abord remercier mon directeur de recherche, Dr. Marc Drolet pour m'avoir accordé l'opportunité de poursuivre mes études supérieures au sein de son équipe. Je lui présente ma profonde gratitude pour sa confiance et sa disponibilité tout au long de ce parcours.

Je tiens aussi à remercier les membres du laboratoire, Valentine Usongo, Jill Harmony Egbe qui m'ont soutenu et conseillé dans mon projet. Je leur dis merci pour m'avoir appris les différentes techniques dès mon arrivée au laboratoire.

Je souhaite également remercier les membres du département et particulièrement Martin Clément et Jean Lauzer pour leur bonne humeur et leur humour chaleureux.

Je remercie toute ma famille qui m'a fourni tout le soutien moral pour garder espoir et persévérer dans la réalisation de ma quête. Malgré leur présence lointaine, elle a été plus proche que loin pour m'encourager.

1. Revue de littérature

1.1 Introduction

Depuis le début du vingtième siècle, l'acide désoxyribonucléique (ADN) est la molécule la plus importante ayant suscité un vif intérêt et suscité de nombreux conflits idéologiques au sein de la communauté scientifique quant à son rôle dans l'hérédité. Malgré le fait qu'elle était déjà connue en 1869 grâce à Fritz Miescher, la molécule d'ADN demeurait une véritable énigme. Au cours des années 1930-1940, la pensée générale attribuait à l'ADN un rôle uniquement «structurel dans les chromosomes» (Frank-Kamenetskiĭ, 1996). En effet, les généticiens affirmaient que les protéines étaient seules porteuses de l'information génétique. C'est seulement en 1944 que cette théorie est ébranlée et remise en question par les travaux d'Oswald Avery qui établirent que l'ADN joue un rôle primordial dans la transmission de l'hérédité car il est le support de l'hérédité (Avery *et al.*, 1944). Cette conclusion eût un impact majeur et stimula la recherche autour de l'ADN.

Chez les organismes eucaryotes, l'ADN est présente dans le noyau des cellules sous forme de plusieurs chromosomes linéaires à deux extrémités : c'est l'ADN nucléaire.

On retrouve aussi l'ADN mitochondrial ou encore l'ADN chloroplastique présente chez les organismes photosynthétiques. Chez les procaryotes, les cellules possèdent généralement un chromosome sous forme circulaire qui se retrouve uniquement dans le compartiment cytoplasmique, car il y a absence de noyau. Cet ADN circulaire est fermé et n'a pas d'extrémités. L'ADN peut aussi se retrouver sous forme de simple brin. Dans ce cas, l'ADN est formé d'une seule chaîne poly-nucléotidique. On le retrouve chez certains virus. Malgré cette différence spatiale et quantitative, la fonctionnalité de cette molécule demeure la même pour tous les organismes: support du bagage génétique. Mais, c'est grâce à l'assemblage aléatoire de quatre nucléotides distincts que l'ADN tire sa complexité et sa variabilité. Il est impératif que la molécule d'ADN soit condensée pour être maintenue dans une cellule plus petite qu'elle.

1.1.1 Structure de l'ADN

Il y a déjà 60 ans que les chercheurs James Watson et Francis H. Crick proposaient une nouvelle structure pour la molécule d'acide désoxyribonucléique (ADN) qui allait révolutionner le domaine de la biologie moléculaire. La découverte de cette structure a permis de mieux établir les propriétés chimiques et physiques de cette molécule. Mais le plus important résidait dans la compréhension des fonctions de l'ADN. L'une de ces fonctions est la capacité de la molécule d'ADN à se copier. Ce mécanisme de réplication du matériel génétique implique un principe de complémentarité qui avait déjà été mentionné par Chargaff (Pray, 2008).

La double hélice d'ADN possède une structure changeante et très dynamique. Elle est capable de se remodeler et d'adopter des conformations distinctes. Les dimensions et la géométrie de l'ADN peuvent varier donnant ainsi à la molécule des structures secondaires. Ces dernières ont été mises en évidence par une méthode utilisant la diffraction aux rayons X des fibres d'ADN (Wing *et al.*, 1980). Parmi les structures secondaires les plus connues, il y a les structures secondaires dites ADN-A, ADN-B et ADN-Z (**Figure 1**).

La conformation la plus répandue dans les cellules vivantes est dite ADN-B et correspond plus à la structure décrite par Watson et Crick (Watson *et al.*, 1953). C'est la forme biologique la plus importante. Son analyse avait été réalisée en 1980 sur des fibres cristallines (Wing *et al.*, 1980). Cette conformation de la molécule d'ADN se retrouve généralement en solution. Elle est donc plus hydratée. La forme ADN-B se caractérise par une hélice tournant vers la droite avec un pas variant de 10,1 à 10,6 paires de bases par tour (Garrett *et al.*, 2000a). Cette valeur n'est pas fixe et va dépendre des conditions de solution (Bates *et al.*, 1993). L'hélice de la forme B possède un sillon majeur plus long et un sillon mineur plus étroit (Berg *et al.*, 2002). Le diamètre de l'hélice est d'environ 2 nm (ou environ 20 Å) et l'angle de torsion de l'hélice est d'environ 36°. Les paires de bases sont presque perpendiculaires à l'axe de l'hélice (Bates *et al.*, 1993). L'autre conformation est la forme ADN-A qui s'observe lorsque l'humidité relative est en-dessous de 75%. Tout comme l'ADN-B, la forme ADN-A se caractérise par une hélice tournant à droite (Garrett *et al.*, 2000a). Cependant, contrairement à la forme ADN-B, l'hélice droite de l'ADN-A a un sillon majeur plus grand et un sillon mineur plus court (Berg *et al.*, 2002). Les paires de bases qui composent la forme A sont légèrement décalées. Cette forme possède 11 paires de bases par tour (Garrett *et al.*, 2000a).

La forme A de l'ADN n'est pas rigide car elle peut se convertir en ADN-B et passer ainsi de l'ADN déshydraté en ADN hydraté. L'autre type d'hélice est la forme ADN-Z qui tourne à gauche (Bates *et al.*, 1993). Contrairement aux formes A et B qui sont fréquents, cette forme est rare. Les groupements phosphates sont en zigzag. Cette forme se caractérise surtout par l'alternance des guanines (G) et des cytosines (C) sur un même brin d'ADN (Bochman *et al.*, 2012). Cette forme d'ADN peut engendrer de conséquences sévères comme l'instabilité génomique tant chez les procaryotes que chez les eucaryotes (Bochman *et al.*, 2012).

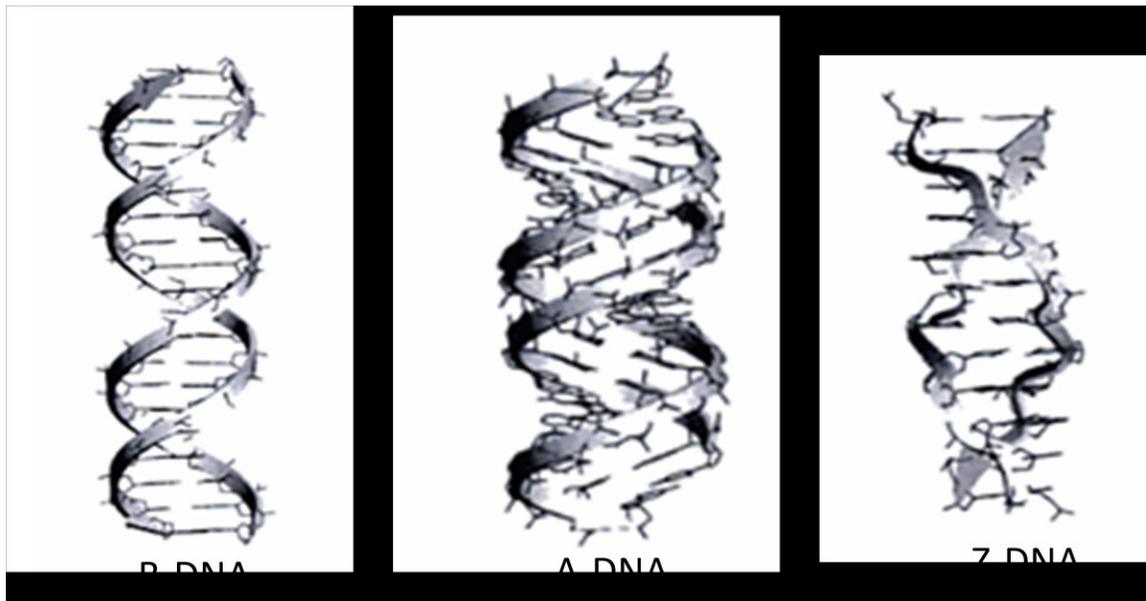


Figure 1: Représentation schématique des trois formes de la double hélice d'ADN (Bates *et al.*, 1993). Figure utilisée avec permission.

Outre les formes ADN-A, ADN-B et ADN-Z, la molécule d'ADN peut avoir d'autres structures secondaires alternatives qui sont considérées comme des formes non B. Parmi celles-ci, on note par exemple les structures cruciformes et les jonctions Holliday, la forme ADN-H ou encore des structures G-quadruplex. Tout comme la forme ADN-Z, ces structures secondaires peuvent être une source d'instabilité du génome (Bochman *et al.*, 2012). Cette instabilité génomique peut varier entre les procaryotes et les eucaryotes. Chez les eucaryotes, les structures secondaires peuvent entraîner des cassures de l'ADN double brin au niveau des régions où elles se forment. Ces cassures peuvent avoir de graves conséquences sur le génome, comme l'inhibition de la réplication et de la transcription (Zhao *et al.*, 2010). Chez les procaryotes, comme chez les eucaryotes, ces structures secondaires peuvent aussi engendrer des délétions, des mutations et autres dommages susceptibles de créer une instabilité du génome (Zhao *et al.*, 2010).

Malgré toutes ces formes changeantes, la molécule d'ADN doit être maintenue dans les cellules. Et pour cela, elle doit adopter une autre structure qui permet sa compaction. Ce nouveau changement de structure se fait à l'aide des protéines SMC (Structural Maintenance of Chromosomes) qui participent à la condensation de l'ADN (Britton *et al.*, 1998). Outre les protéines SMC, le surenroulement aide aussi à compacter l'ADN.

1.1.2 Le Surenroulement de l'ADN

La taille globale de la molécule d'ADN nécessite une réduction considérable dans le compartiment nucléaire (eucaryotes) ou cytoplasmique (procaryotes) (Wang *et al.*, 2013). L'éclaircissement de la structure de l'ADN était un progrès considérable pour la biologie moléculaire mais il fallait aussi comprendre comment l'ADN venait à être compacter, puis de nouveau accessible pour la transcription ou la réplication (Baranello *et al.*, 2012).

L'étude de la topologie de l'ADN a pris naissance en 1963 avec certains groupes de chercheurs, comme Dulbecco et Vogt, qui ont commencé à s'intéresser à l'ADN de certains virus, en particulier celui du virus polyome. Grâce à des analyses de sédimentation, ils observèrent que la même molécule d'ADN pouvait se retrouver sous deux formes distinctes. Ces analyses de sédimentation permettaient de séparer les molécules en fonction de la taille et du niveau de compactage. Parmi les formes observées, ils découvrirent que l'ADN double brins pouvait être circulaire (Dulbecco *et al.*, 1963). Par rapport à l'accessibilité de l'ADN, cette découverte rendaient encore plus difficile la réalisation des processus biologiques.

En 1963, Vinograd et son équipe entama les études sur les propriétés physiques de l'ADN circulaire (Vinograd *et al.*, 1966).

En plus d'être circulaire, la molécule d'ADN était plus compact que la molécule d'ADN linéaire (Drlica, 1984; Vinograd *et al.*, 1965). Vinograd et son équipe observèrent que la compaction de l'ADN circulaire était due à sa capacité de se tordre (Drlica, 1984; Weil *et al.*, 1963). Les deux phénomènes observés, à savoir la torsion et la compaction de l'ADN, ont été appelés surenroulement (Drlica, 1984).

Le surenroulement de la molécule d'ADN joue un rôle primordial dans le dynamisme de la structure topologique de la double hélice d'ADN. Il joue aussi un rôle incontournable dans les transactions cellulaires comme l'accessibilité aux séquences géniques, l'expression des gènes et la capacité de l'ADN à se répliquer. Le surenroulement peut-être défini comme étant une conformation qu'adopte l'ADN, qui est soumise à une force de torsion permettant de rapprocher très intimement des séquences éloignées l'une de l'autre sur l'ADN, ou encore de les distancer dépendamment du niveau de torsion qui est exercé sur la double hélice. La molécule d'ADN peut avoir différents états selon le niveau de surenroulement.

On distingue trois types d'états que peut prendre l'ADN : l'état de surenroulement positif, l'état de surenroulement négatif et l'état de relaxation (**Figure 2**). Dans une molécule d'ADN bicatenaire, les deux brins s'enroulent l'un autour de l'autre après une série de 10 paires de bases par tour. Ce principe correspond à la forme normale de l'ADN-B décrite par Watson et Crick. C'est l'état classique observé dans les cellules et c'est l'état de relaxation de l'ADN dépourvu de surenroulement. La contrainte faite sur la double hélice est minimale et stable. L'ADN est dit surenroulé positivement lorsque le nombre de tours augmente par rapport à la normal, et que l'enlacement des deux brins s'effectue dans le même sens que l'hélice. L'ADN est dit surenroulé négativement lorsque le nombre de tours diminue et que les deux brins d'ADN s'enroulent dans le sens contraire par rapport à l'axe de l'hélice. Le surenroulement négatif fût démontré par Vinograd et son équipe (Vinograd *et al.*, 1966).

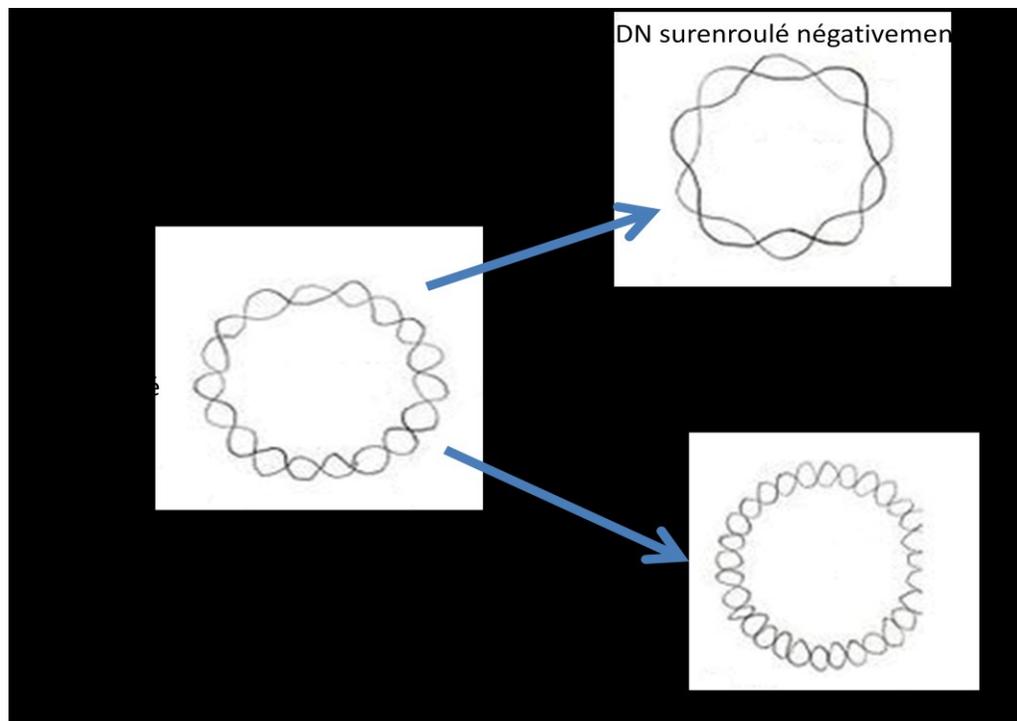


Figure 2 : Représentation des états de surenroulement de la double hélice d'ADN. Le surenroulement négatif est caractérisé par un désenroulement de l'ADN qui réduit le nombre d'enlacement de la double hélice. À l'opposé, le surenroulement positif crée plus de torsion dans la double hélice. (<http://commons.wikimedia.org>)

La topologie de l'ADN circulaire fermé se décrit par trois paramètres selon la relation : $Lk = W + T$ (Vinograd *et al.*, 1966). Dans cette équivalence, Lk , pour «*Linking number*», représente le nombre d'enlacement.

Ce paramètre correspond au nombre de fois où un brin d'ADN s'enroule autour de l'autre (Drlica, 1984; Lodish, 1997; Worcel *et al.*, 1981). Le «*Linking number*» est une propriété topologique de la double hélice d'ADN circulaire (Bates *et al.*, 1993). Ce nombre va déterminer le niveau de surenroulement de l'ADN et cette valeur est entière et constante (Bates *et al.*, 1993). Un ADN linéaire peut aussi subir un surenroulement en présence de torsions. Le second paramètre T, pour «*Twist*», correspond à la torsion. Ce paramètre représente le nombre de tours que fait un brin autour de l'autre brin sur la même distance. Le troisième paramètre W, pour «*Writhe*», correspond à l'enroulement de la double hélice d'ADN autour d'elle-même, autrement dit, il fait référence à la forme de la molécule d'ADN dans sa totalité (Bates *et al.*, 1993).

Le surenroulement de l'ADN va jouer un rôle majeur dans les processus cellulaires tels que le compactage, la transcription, la régulation de certains gènes, la réplication (Baranello *et al.*, 2012) ou encore la recombinaison homologe (Mizuuchi *et al.*, 1980).

Chez les organismes eucaryotes, il existe d'autres mécanismes pour le compactage des chromosomes comme les histones. Le surenroulement va aussi permettre le rapprochement et l'attachement des protéines à l'ADN (Vologodskii *et al.*, 1996), mais va également intervenir

dans la ségrégation des chromosomes (Martinez-Robles *et al.*, 2009). Chez la plupart des organismes vivants (procaryotes et eucaryotes), l'ADN est surenroulé négativement. Le surenroulement négatif va permettre la condensation du chromosome bactérien. L'accessibilité de certaines séquences géniques requiert du surenroulement négatif qui favorise l'ouverture des brins d'ADN (Chen *et al.*, 1994; Pruss *et al.*, 1989). Cette ouverture permettra la transcription et ainsi la synthèse protéique. En plus de l'initiation de la transcription, le surenroulement négatif favorise l'initiation de la réplication en séparant les brins d'ADN (Funnell *et al.*, 1987; Zechiedrich *et al.*, 2000). Présenté ainsi, le surenroulement vient à être un moteur vital pour les cellules. Il est essentiel à la régulation dans la cellule (Zechiedrich *et al.*, 2000). Les différents changements topologiques dans la molécule d'ADN doivent être contrôlés et l'équilibre du surenroulement doit être maintenu. Une des caractéristiques observées durant la progression de la réplication est l'accumulation du surenroulement positif en avant de l'ADN polymérase (Wang, 1996; Zechiedrich *et al.*, 2000). De même, durant l'élongation de la transcription, il se crée un surenroulement négatif en arrière de l'ARN polymérase et un surenroulement positif en avant de l'ARN polymérase (Zechiedrich *et al.*, 2000).

Tous ces changements dans l'état de surenroulement de l'ADN nécessitent un contrôle absolu et constant. Le maintien et l'équilibre du surenroulement sont contrôlés par l'action d'enzymes exceptionnelles appelées topoisomérases (Valenti *et al.*, 2011). Chez les bactéries comme *E. coli*, l'action opposée et simultanée de deux topoisomérases permet d'équilibrer le surenroulement, soit par la relaxation du surenroulement négatif, soit par relaxation du surenroulement positif (Chen *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1987; Pruss *et al.*, 1986).

1.1.3 Les topoisomérases

La découverte des topoisomérases (Topos) a été possible grâce à Wang et Gellert (Drlica, 1984; Gellert *et al.*, 1976a). Les inhibiteurs des topoisomérases ont permis de découvrir le rôle clé de ces enzymes dans le maintien du surenroulement de l'ADN et donc dans la réalisation des processus cellulaires (Drlica, 1992; Wang, 1996). Les topoisomérases sont des enzymes ubiquitaires indispensables à toutes les transactions faites sur l'ADN (Cheng *et al.*, 2003; Lopez *et al.*, 2005). Tous les processus cellulaires vont créer une torsion dans l'axe de l'ADN et générer du surenroulement (Rampakakis *et al.*, 2010).

Les topoisomérases sont nécessaires à la réplication, la transcription, la recombinaison, la condensation et la ségrégation des chromosomes (Champoux, 2001; Duguet *et al.*, 1994; Forterre *et al.*, 2007). Les topoisomérases vont modifier le nombre d'enlacements entre les deux brins et mettre l'ADN dans un état capable d'initier la réplication, la transcription et la recombinaison (Duguet *et al.*, 1994).

Les topoisomérases sont regroupées en deux classes : les topoisomérases de type I et de type II (Zhu *et al.*, 2001). La différence entre les deux classes de topoisomérases réside dans leur mode de coupure. En effet, les topoisomérases de classe I catalysent la coupure d'un seul brin alors que celles de classe II produisent une coupure des deux brins (Duguet *et al.*, 1994; Terekhova *et al.*, 2012; Wang, 1996). Malgré cette distinction, elles possèdent le même mode opératoire : coupure du ou des brins d'ADN, passage d'un brin ou des deux brins à travers la coupure par modification du «*Linking number*» et fermeture de la coupure (Duguet *et al.*, 1994; Wang, 1996). Les topoisomérases de classe I sont divisées en trois sous-groupes : IA, IB et IC. Quant aux enzymes de classe II, elles comprennent deux sous-groupes : IIA et IIB (Baker *et al.*, 2009; Terekhova *et al.*, 2012). Chez *E. coli*, quatre topoisomérases ont été identifiées et décrites : la topoisomérase (topo) I, la gyrase ou topoisomérase II (Gellert *et al.*, 1976a),

la topoisomérase III et la topoisomérase IV (Kato *et al.*, 1990). Dans les prochaines sections, nous nous concentrerons sur ces quatre enzymes.

1.1.3a Les topoisomérases de type IA

Les topoisomérases de type IA sont présentes chez les eucaryotes, les bactéries et les archaebactéries (Cheng *et al.*, 2003; Forterre *et al.*, 2007; Viard *et al.*, 2004). Elles sont monomériques et leur activité enzymatique est indépendante de l'ATP (Duguet *et al.*, 1994). Par contre, elles sont dépendantes du Mg^{2+} pour être capable de relaxer le surenroulement négatif de l'ADN double brins (Champoux, 2001). Elles ont aussi la capacité de nouer ou de dénouer des nœuds dans l'ADN (Terekhova *et al.*, 2012; Tse *et al.*, 1980).

Ces enzymes vont cliver un brin d'ADN (**Figure 3**) en formant une liaison covalente transitoire entre un résidu tyrosine et l'extrémité 5' phosphate de l'ADN généré lors du clivage (Champoux, 2001). L'autre extrémité du brin clivé reste attachée à l'enzyme (Baker *et al.*, 2009; Viard *et al.*, 2004).

Dans la classe de type IA, on retrouve les enzymes bactériennes suivantes : la topoisomérase I codée par le gène *topA* et la topoisomérase III codée par le gène *topB* (Broccoli *et al.*, 2000; Wang, 1996).

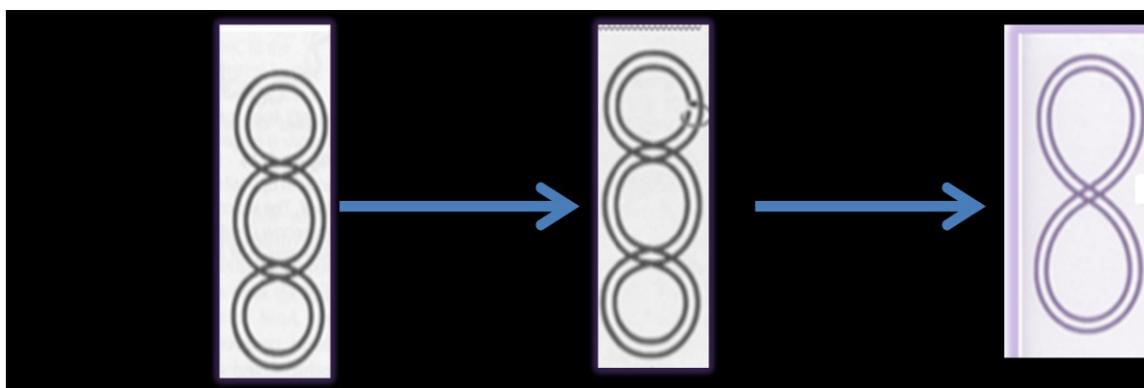


Figure 3 : Représentation de l'action des topoisomérases de type I (la topoisomérase I codée par le gène *topA* et la topoisomérase III codée par le gène *topB*. Clivage d'un seul brin d'ADN (Snyder *et al.*, 2013). Figure utilisée avec permission.

1.1.3a.1 La topoisomérase I

C'est la première topoisomérase découverte et connue sous le nom de protéine oméga (ω) et capable de réduire le surenroulement négatif (Depew *et al.*, 1978). C'est un polypeptide de 110,000 daltons (Fishel *et al.*, 1984) codé par le gène *topA* et situé à côté du gène *cysB* (Sternglanz *et al.*, 1981; Trucksis *et al.*, 1981). La topoisomérase I (TopA) permet de relaxer le surenroulement négatif en arrière du complexe de transcription (Stupina *et al.*, 2005). De plus, elle permet aussi de relaxer l'excès de ce surenroulement négatif généré par la gyrase. La topoisomérase I est l'enzyme la plus étudiée car son rôle dans la régulation du surenroulement ne cesse d'être documenté. Son action est opposée à celle effectuée par la gyrase mais, combinées ensemble, la topoisomérase I et la gyrase équilibrent le niveau de surenroulement de l'ADN (Drlica, 1992).

Des études sur des cellules *d'E. coli* dépourvues d'une topoisomérase I fonctionnelle ($\Delta topA$) ont révélé des défauts de croissance sévères. Ces défauts de croissance sont principalement causés par un excès de surenroulement négatif, surtout concentré derrière l'ARN polymérase et les protéines associées à la transcription (Massé *et al.*, 1999).

Il avait d'abord été montré que les mutants $\Delta topA$ avaient une croissance normale (Sternglanz *et al.*, 1981). Mais, il s'est avéré par la suite que la croissance presque normale de ces mutants était soutenue par l'apparition des mutations compensatoires. Ces mutations compensatoires se situent dans une des deux sous-unités du gène codant pour la gyrase (DiNardo *et al.*, 1982; Pruss *et al.*, 1982). Elles aident à corriger les défauts de croissance en causant une diminution de l'activité de surenroulement de la gyrase (DiNardo *et al.*, 1982; Hammond *et al.*, 1991; Pruss *et al.*, 1982).

De plus, l'excès de surenroulement négatif va causer la formation d'hybrides ARN-ADN appelés R-loops (Drolet *et al.*, 1994; Massé *et al.*, 1999). Les études montrent que la surproduction de la RNaseHI est capable de réduire partiellement les défauts de croissance des mutants *topA* en supprimant les R-loops (Drolet *et al.*, 1994; Massé *et al.*, 1999).

1.1.3a.2 La topoisomérase III

La topoisomérase III est une enzyme très conservée au fil de l'évolution (Lopez *et al.*, 2005). Chez *E. coli*, la topoisomérase III n'est clairement pas essentielle puisque son absence ne cause aucun effet négatif sur la croissance (DiGate *et al.*, 1989).

Tout comme la topoisomérase I, la topoisomérase III (*topB*) est capable de relaxer le surenroulement, mais pas de manière aussi efficace que le ferait la topoisomérase I (DiGate *et al.*, 1988). La topoisomérase III peut aussi démêler des nœuds sur des régions simple brin de l'ADN (DiGate *et al.*, 1988; Lopez *et al.*, 2005). Son rôle a été aussi observé dans la décaténation des duplexes d'ADN (DiGate *et al.*, 1988). Cependant, son action est beaucoup moins efficace que la topoisomérase IV, enzyme clé pour la décaténation de l'ADN dans la cellule (Lopez *et al.*, 2005). La topoisomérase III pourrait jouer un rôle dans la réplication (DiGate *et al.*, 1988) et est aussi nécessaire à la séparation des chromosomes (Zhu *et al.*, 2001).

Il a été montré que cette enzyme pouvait supprimer les structures d'enlacements, désignées caténanes, qui se forment lors de la réplication (Hiasa *et al.*, 1994; Nurse *et al.*, 2003; Peter *et al.*, 1998).

Mais en réalité, l'absence de la topoisomérase III n'entraîne pas une augmentation des caténanes. Alors que la perte de la topoisomérase IV provoque un fort taux de caténanes (Lopez *et al.*, 2005). Par définition, une réaction de caténation survient durant le mécanisme de réplication de l'ADN. Les structures caténanes se caractérisent par l'enroulement des molécules d'ADN nouvellement synthétisées l'une autour de l'autre.

Enroulées ainsi, les nouvelles molécules d'ADN vont former des enchevêtrements qui les empêchent de se séparer. Ceci entraîne un blocage de la ségrégation des chromosomes. En collaboration avec l'hélicase RecQ, la topoisomérase III peut enchaîner ou désenchaîner deux molécules d'ADN circulaires ensemble : c'est une réaction de caténation (Harmon *et al.*, 2003; Harmon *et al.*, 1999; Lopez *et al.*, 2005).

Des études ont également montré que la surproduction de la topoisomérase III pouvait soutenir la croissance de mutants *topA* (Broccoli *et al.*, 2000). Elle pourrait être impliquée dans la recombinaison homologue (Zhu *et al.*, 2001).

Des études sur des cellules d'*E. coli* dépourvues de la topoisomérase III ont montré une amplification de la recombinaison et l'apparition de nombreuses mutations (Lopez *et al.*, 2005; Schofield *et al.*, 1992).

1.1.3b Les topoisomérases de type IIA

Les topoisomérases de type IIA sont des enzymes multimériques (Duguet *et al.*, 1994). Elles ont un substrat différent des topoisomérases de type I. En effet, les topoisomérases de type IIA sont capable de cliver les deux brins d'ADN simultanément (**Figure 4**).

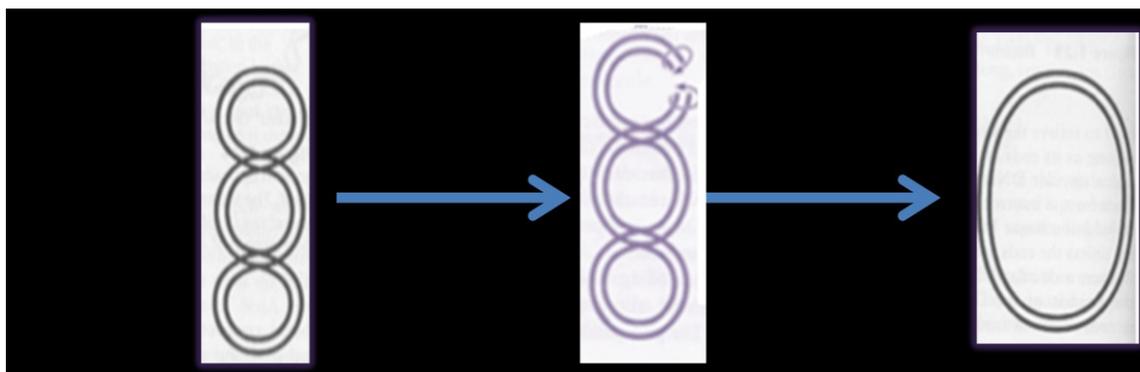


Figure 4 : Représentation de l'action des topoisomérases de type II (la gyrase et la topoisomérase IV) sur la double hélice d'ADN. Clivage de deux brins d'ADN à la fois (Snyder *et al.*, 2013). Figure utilisée avec permission.

La réaction de clivage exige la présence d'ATP et du Mg^{2+} (Sugino *et al.*, 1978). Elles vont couper les brins d'ADN et catalyser le passage d'un brin via la brèche générée temporairement (Champoux, 2001; Liu *et al.*, 1980; Mizuuchi *et al.*, 1980).

Comme les topoisomérases de type IA, les topoisomérases de type IIA vont établir une liaison covalente transitoire entre un résidu tyrosine et l'extrémité 5' phosphate de l'ADN (Forterre *et al.*, 2007). Les topoisomérases de type IIA vont relaxer le surenroulement positif et le surenroulement négatif. Elles peuvent faire les réactions de caténation et de décaténation (Steck *et al.*, 1984). Les topoisomérases de type IIA sont essentielles à la ségrégation des chromosomes et donc à la division cellulaire. Les topoisomérases de type IIA comprennent la topoisomérase IV et la gyrase retrouvées chez *E. coli*.

1.1.3b.1 La gyrase

La gyrase est une enzyme qui permet la relaxation de l'ADN surenroulé positivement en ADN surenroulé négativement (Gellert *et al.*, 1976a; Gellert *et al.*, 1976b).

Des études sur la modulation de la transcription par le surenroulement de l'ADN ont montré que l'expression des gènes de la gyrase était induite par la relaxation de l'ADN (Menzel *et al.*, 1987).

La gyrase est la cible de certains antibiotiques de la famille des quinolones comme l'acide nalidixique ou la ciprofloxacine (Drlica, 1984; Fabrega *et al.*, 2009). Les quinolones, en inactivant l'activité de la gyrase, affecte le surenroulement négatif généré par la gyrase (Gellert *et al.*, 1976b). Ce qui a pour conséquence de ralentir la réplication et la transcription (Gellert *et al.*, 1976b). La gyrase est une enzyme indispensable aux mécanismes cellulaires comme la réplication et la transcription chez *E. coli* (Goss *et al.*, 1964; Jovanovich *et al.*, 1987) car elle favorise l'accessibilité au code génétique (Travers *et al.*, 2007; Zechiedrich *et al.*, 2000). Elle est composée de deux sous-unités encodées par les gènes *gyrA* et *gyrB*. La sous-unité GyrB est le site de fixation de l'ATP. Tandis que la sous-unité GyrA sert de ciseau pour faire des coupures temporaires dans l'ADN double brins. La gyrase est la seule enzyme qui peut introduire du surenroulement négatif dans l'ADN. La gyrase est essentielle à la survie des cellules, on ne peut donc déléter ni *gyrA* ni *gyrB* (Kreuzer *et al.*, 1979; Schmid, 1990; Zechiedrich *et al.*, 1995).

Le surenroulement négatif est primordial pour la cellule. Contrairement aux topoisomérases I, III, l'activité de la gyrase est dépendante de l'ATP.

Sa capacité à introduire du surenroulement négatif va changer en fonction du ratio ATP/ADP *in vitro* et *in vivo* (Brown *et al.*, 1979). Des études ont révélé que la gyrase pouvait agir comme la topoisomérase IV dans certaines circonstances. En effet, Il a été démontré qu'une délétion dans la région C-terminal de la sous-unité GyrA entraînait la perte de la capacité de la gyrase à introduire le surenroulement négatif, mais qu'elle gardait son pouvoir de relaxer l'ADN comme la topoisomérase IV (Hiasa *et al.*, 2000; Kampranis *et al.*, 1996). La gyrase est au centre de tous les processus cellulaires. Bien avant la découverte de la topoisomérase IV, le rôle principal de la décaténation était confié à la gyrase (Steck *et al.*, 1984; Zechiedrich *et al.*, 2000). Cependant, le rôle que joue la gyrase dans la décaténation semble être secondaire. La topoisomérase IV est l'acteur clé de ce mécanisme.

1.1.3b.2 La topoisomérase IV

La topoisomérase IV est une enzyme hétérotétramérique structurée en deux sous-unités codées par les gènes *parC* et *parE* (Kato *et al.*, 1992; Peng *et al.*, 1993a, 1993b). Les gènes *parC* et *parE* sont respectivement des homologues de *gyrA* et *gyrB* de la gyrase (Luttinger *et al.*, 1991; Springer *et al.*, 1993). Donc, tout comme la sous-unité GyrB de la gyrase, la sous-unité ParE constitue le site de fixation de l'ATP et la seconde sous-unité ParC se fixe à l'ADN. La topoisomérase IV joue un rôle principal dans la décaténation (Adams *et al.*, 1992; Khodursky *et al.*, 1995). Elle défait les chromosomes nouvellement synthétisés durant la réplication (Espeli *et al.*, 2004; Witz *et al.*, 2010). Lors de la recombinaison ou encore durant la réplication, les brins d'ADN peuvent s'entremêler et bloquer la ségrégation des chromosomes et la division cellulaire (Zechiedrich *et al.*, 1997).

Il a été montré que l'inactivation de la topoisomérase IV provoquait une accumulation des caténanes durant la réplication (Zechiedrich *et al.*, 1995). Mais son rôle de décaténase est surtout facilité par le surenroulement négatif que génère la gyrase (Zechiedrich *et al.*, 1995;

Zechiedrich *et al.*, 1997). La décaténation n'est pas la seule activité attribuée à la topoisomérase IV.

Il a été montré que la topoisomérase IV était aussi capable de maintenir le niveau de surenroulement en relaxant l'ADN (Khodursky *et al.*, 1995; Zechiedrich *et al.*, 2000). En effet, tout comme la topoisomérase I, la topoisomérase IV est capable de relaxer le surenroulement négatif introduit par la gyrase (Zechiedrich *et al.*, 2000).

Les topoisomérase I, IV et la gyrase interagissent ensemble pour contrôler le surenroulement (Zechiedrich *et al.*, 2000). Comme pour les gènes *gyrB* et *gyrA* de la gyrase, l'inactivation des gènes *parC* et *parE* est létale pour la cellule (Adams *et al.*, 1992). Tout comme la gyrase, la topoisomérase IV est inhibée par les quinolones (Kato *et al.*, 1992; Kumagai *et al.*, 1996).

1.2 Contexte de la collision entre la réplication et la transcription

1.2.1 La topoisomérase I

Comme nous l'avons déjà mentionné, la topoisomérase I contrebalance le surenroulement négatif introduit par la gyrase en relaxant ce surenroulement.

Ses principales fonctions démontrées sont notamment la relaxation du surenroulement négatif durant la transcription et la prévention de la formation des R-loops. Les mutants *topA* présentent un excès de surenroulement négatif et l'apparition des R-loops.

La topoisomérase I joue un rôle dans la stabilité du génome chez *E. coli*. Plusieurs facteurs sont à l'origine de l'instabilité génomique. Le déséquilibre du surenroulement est un des facteurs majeurs. Chez les mutants *topA*, la gyrase est très active et le surenroulement négatif est donc très élevé. L'hypersurenroulement généré engendre l'apparition des R-loops. Hybrides ARN-ADN, les R-loops se forment lors de la transcription. Chez les bactéries, la réplication et la transcription se déroulent dans le même compartiment. De plus, la vitesse de réplication est dix fois plus rapide que celle de la transcription.

Les R-loops vont ralentir le complexe de réplication, ce qui entraînera l'arrêt des fourches de réplication. On assiste à une collision entre la réplication et la transcription. Le redémarrage et la terminaison de la réplication sont essentiels pour la ségrégation, mais aussi pour la division cellulaire. À défaut de restaurer la réplication, il y a des défauts de croissance qui apparaissent.

1.2.2 Réplication de l'ADN

Chez les bactéries, l'initiation de la réplication se fait au niveau d'une seule origine appelée *oriC* (Rampakakis *et al.*, 2010). *oriC* comprend des séquences d'ADN permettant l'attachement de DnaA, appelées boîtes DnaA. L'origine se constitue aussi de séquences répétées riches en A et T. Le démarrage de la réplication au niveau d'*oriC* nécessite la formation d'un complexe protéique comprenant notamment les protéines DnaA, DnaB, DnaC et les protéines Fis et HU (Histone like protein from *E. coli* strain) (Funnell *et al.*, 1986).

Chez *E. coli*, la réplication est catalysée par l'ADN polymérase III (Lestini *et al.*, 2007). Elle est composée de plusieurs sous-unités. Mais ces protéines ne sont pas les seules à être indispensables au bon déroulement de la réplication. Le surenroulement négatif généré par la gyrase est requis pour initier la duplication de la molécule d'ADN (Funnell *et al.*, 1986). La protéine initiatrice est la protéine DnaA. Cette protéine possède une activité ATPasique. Elle se fixe à plusieurs sites DnaA qui sont des séquences de 9 pb (Funnell *et al.*, 1986). La protéine DnaA va se fixer à l'origine de réplication *oriC* et va permettre l'ouverture de la double hélice d'ADN. Ceci permet le recrutement de la protéine DnaB.

La protéine DnaB est une hélicase répllicative qui fait également partie du réplisome par association avec la protéine DnaG, une primase (Lestini *et al.*, 2007; Michel *et al.*, 2007; O'Donnell, 2006). Chez *E. coli*, en plus des protéines DnaB et DnaG, le réplisome est composé d'un dimère de la polymérase III. La fréquence de réplication est aussi dépendante de la qualité du milieu. En effet, dans un milieu riche, la cellule entame plusieurs rondes de réplifications avant la fin de la réplication du chromosome (Kubitschek *et al.*, 1971). Le facteur servant de signal à l'initiation de la réplication est l'atteinte de la masse d'initiation.

1.2.3 Transcription

Chez les procaryotes, la transcription se résume en quatre différentes étapes toutes importantes pour son bon déroulement: L'interaction physique de l'ARN polymérase avec l'ADN au niveau du promoteur et la formation de la bulle de transcription ; l'initiation de la réaction de polymérisation; l'élongation du brin d'ARN naissant et la terminaison de la transcription (Garrett *et al.*, 2000b). La première étape est la liaison de l'ARN polymérase ADN dépendante à l'ADN matrice (Garrett *et al.*, 2000b).

Durant cette étape l'ARN polymérase, grâce au facteur σ , reconnaît le promoteur avec lequel elle forme un complexe fermé (Garrett *et al.*, 2000b). L'ARN polymérase va catalyser la polymérisation de la séquence complémentaire du brin qui sert de modèle. Chez *E. coli*, l'ARN polymérase ou holoenzyme est une enzyme composée de cinq sous-unités $\alpha_2\beta\beta'\sigma$.

La transcription est accompagnée de variations dans les états de surenroulement de l'ADN. En effet, au fur et à mesure que l'ADN est transcrit, il doit être déroulé puis enrôlée. La transcription nécessite surtout du surenroulement négatif qui permet l'accès aux séquences géniques. Les topoisomérases jouent un rôle dans l'initiation de la transcription (Drolet *et al.*, 1994; Fleischmann *et al.*, 1984; Muller *et al.*, 1985). Le surenroulement négatif généré par la gyrase est nécessaire à la transcription mais permet aussi la formation des R-loops (Drolet *et al.*, 1994).

1.2.4 R-loops

Les R-loops sont des hybrides ARN-ADN retrouvés chez les bactéries ainsi que chez les eucaryotes (Gan *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2006). Ce sont des structures qui surviennent au moment de la transcription.

Le brin d'ARN qui se forme en arrière de l'ARN polymérase va s'hybrider au brin d'ADN matrice qui sert de modèle pour la transcription (Gan *et al.*, 2011). Les R-loops sont des cibles de la RNaseHI. La RNaseHI est une endoribonucléase qui va dégrader spécifiquement l'ARN couplé à l'ADN matrice (Phoenix *et al.*, 1997) en hydrolysant le lien phosphodiester de l'ARN. La RNaseHI est présente chez *E. coli* et elle est codée par le gène *rnhA* (Itaya, 1990; Kanaya *et al.*, 1983).

La topoisomérase I et la RNaseHI vont empêcher la formation des R-loops (Phoenix *et al.*, 1997). Comme elles ciblent ensemble les R-loops, la topoisomérase I et la RNaseHI peuvent s'aider mutuellement pour supprimer ces structures. En effet, la croissance des mutants *topA* est aidée par la production de la RNaseHI (Phoenix *et al.*, 1997). Des études ont révélé que dans les mutants *topA*, il y a un hypersurenroulement négatif qui est augmenté et qui va permettre l'apparition des R-loops (Massé *et al.*, 1999). Lorsqu'il y a plus de surenroulement négatif, les brins d'ADN restent déroulés et séparés. Comme la molécule d'ADN est présente sous forme de simple brin et que la transcription se poursuit, un des brins d'ADN est hybridé à l'ARN durant la synthèse de celui-ci.

1.2.5 Arrêt des fourches de réplication : Causes et conséquences

L'arrêt des fourches de réplication constitue une source majeure d'instabilité génomique (Boubakri *et al.*, 2010; Michel, 2000). Cet arrêt peut avoir des conséquences considérables sur la viabilité cellulaire si la terminaison de la réplication n'est pas prise en charge rapidement.

Les cellules, tant chez les organismes eucaryotes ou encore les procaryotes, mettent en place des systèmes capables de réparer les fourches de réplication arrêtées. Chez les eucaryotes, des protéines sont recrutées pour stabiliser et contrôler les fourches arrêtées. Tandis que chez les procaryotes, des protéines sont sollicitées pour reprendre la réplication en dehors de l'origine de réplication (Lecoïnte *et al.*, 2007; Sandler, 2000). Plusieurs facteurs peuvent provoquer l'arrêt des fourches de réplication en mouvements. L'un de ces facteurs est la transcription. Comme on le sait, la réplication et la transcription se déroulent au même endroit chez les bactéries. De plus, la réplication se réalise dix fois plus vite que la transcription. Cela permet au complexe de réplication de rejoindre rapidement celui de la transcription.

L'effet attendu n'est rien d'autre qu'une collision entre la réplication et la transcription. Les fourches arrêtées sont prises en charge par différentes protéines de recombinaison (Lestini *et al.*, 2007).

1.2.5.1 Cause et conséquence des fourches arrêtées au niveau de la recombinaison

Les protéines de recombinaison jouent un rôle primordial dans la réparation des fourches de réplication bloquées par des obstacles lors de leur progression (Michel *et al.*, 2007). Chez les bactéries comme *E. coli*, la recombinaison homologue est dépendante de la protéine RecA (Petit *et al.*, 2002). La protéine RecA est l'actrice principale de la recombinaison homologue (Michel *et al.*, 2007). La protéine RecA permet l'échange de brins suite à une reconnaissance d'homologie entre les molécules d'ADN (Petit *et al.*, 2002). Deux voies vont faciliter la fixation de la protéine RecA sur l'ADN : la voie RecFOR et la voie RecBCD (Petit *et al.*, 2002). La voie RecBCD fournit le substrat à la protéine RecA en permettant à cette-dernière de se fixer à l'ADN simple brin.

Cette voie possède une activité exonucléase ($5' \rightarrow 3'$) qui dégrade l'ADN double brin en agissant aux extrémités (Lestini *et al.*, 2008). Le système RecBCD va dégrader l'ADN double brin jusqu'à rencontrer la séquence appelé *chi* (Lestini *et al.*, 2008) (**Figure 5**).

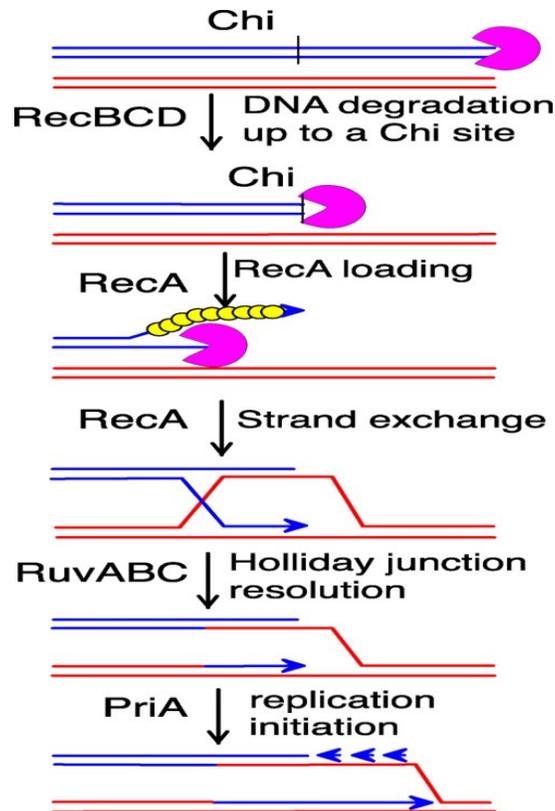


Figure 5 : Recombinaison initiée par le système RecBCD. RecBCD s'attache à l'extrémité 3' de l'ADN et ouvre les brins grâce à l'activité hélicase de RecB. L'ADN est dégradé jusqu'au site *chi*. Un changement de polarité de RecBCD permet la libération du bout 3' et la fixation de RecA. (Michel *et al.*, 2004). Figure utilisée avec permission.

La voie RecFOR est une voie très active chez les mutants *recBCD*. Elle cible particulièrement l'ADN simple brin et fournit ainsi le substrat à la protéine RecA. Cette voie de recombinaison va agir au niveau des fourches de réplication bloquées. Le complexe RecFOR peut aussi agir avec les hélicases RecQ et RecJ. RecQ possède une activité de translocase alors que RecJ est une exonucléase (**Figure 6**).

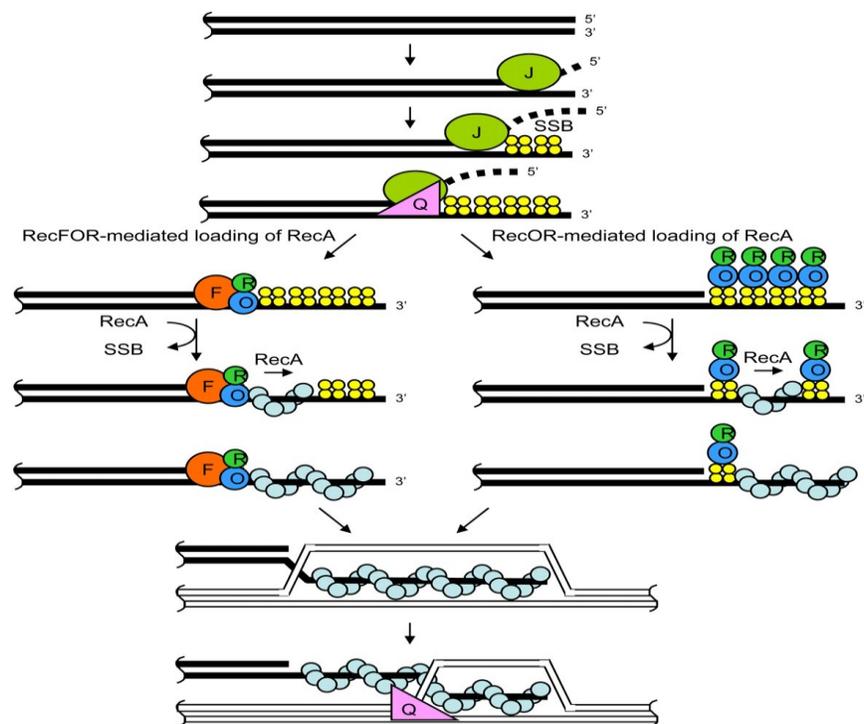


Figure 6 : Chargement de la protéine RecA par le système RecFOR ou RecOR. L'ADN est dégradé par RecJ et les protéines SSB sont chargées sur le brin simple non-dégradé. À gauche, RecFOR se lie à l'extrémité 5' du brin dégradé et remplace SSB par RecA. À droite, en absence de RecF, RecOR enlève plusieurs SSB à la fois et charge RecA. (Handa *et al.*, 2009).

Il a été montré que la réplication avait un lien très étroit avec le processus de recombinaison (Kline *et al.*, 2005; Kogoma *et al.*, 1996; Sandler *et al.*, 1996). Lorsque les fourches de réplifications sont bloquées et que la réplication est arrêtée, la recombinaison peut permettre le redémarrage de la réplication en mettant en place une nouvelle machinerie de réplication.

Ces intermédiaires de recombinaisons vont être formés au point de blocage des fourches et ils comprennent les différentes protéines membres des voies RecFOR et RecBCD (Kline *et al.*, 2005). La recombinaison homologue est un facteur important dans la réparation des dommages causés aux fourches de réplication. Cependant l'accumulation des intermédiaires de recombinaison peut générer de l'hyper-recombinaison au niveau des fourches arrêtées. Dans ce cas, au lieu de favoriser la terminaison de la réplication, la recombinaison pourrait bloquer davantage la progression des fourches et engendrer des défauts de ségrégation.

1.2.5.2 Cause et conséquence des fourches de réplication arrêtées au niveau de la transcription et de la réplication

Durant la transcription, les ARN polymérase sont très nombreuses. Ceci peut entraîner les collisions entre la réplication et la transcription. En fait, la transcription est une des principales causes de la collision avec la réplication (Vilette *et al.*, 1995; Vilette *et al.*, 1992). Ce blocage de la progression des fourches génère un sérieux problème d'instabilité génomique (Baharoglu *et al.*, 2010) et le redémarrage de la réplication après l'arrêt des fourches devient donc primordial. Le redémarrage se fait à l'aide de la protéine PriA (Lestini *et al.*, 2007).

PriA est une protéine dotée de plusieurs fonctions. Elle possède une activité ATPase, une activité d'hélicase et aussi une activité de translocation (Sandler *et al.*, 2000). La protéine PriA est une enzyme clé pour redémarrer la réplication. Elle va permettre le chargement de l'hélicase DnaB et reconstruire un nouveau réplisome (Sandler *et al.*, 2000). La protéine PriA va permettre de débiter une autre ronde de réplication à partir des intermédiaires de recombinaison (Michel *et al.*, 2004).

De plus, le recul des fourches de réplication joue un rôle dans le redémarrage de la réplication arrêtée (Michel *et al.*, 2001; Michel *et al.*, 2004).

1.2.6 Contexte des hélicases

Les hélicases se retrouvent dans tous les domaines de vie. Elles constituent un support considérable dans l'organisation des processus cellulaires touchant l'ADN tels que la réplication, la transcription, la recombinaison ou encore la réparation de l'ADN endommagé (McRobbie *et al.*, 2012; Veaute *et al.*, 2005). Pour certaines d'entre elles, leur rôle dans la cellule n'est pas très bien connu (Veaute *et al.*, 2005). Cependant des études récentes ont montré que certaines hélicases avaient la capacité de supprimer les obstacles sur l'ADN. La première hélicase découverte et œuvrant à enlever les obstacles sur l'ADN fût l'hélicase T4 dda (Bedinger *et al.*, 1983; Boubakri *et al.*, 2010).

Ces hélicases ont été regroupées en différentes classes dépendamment des séquences conservées et aussi selon leur polarité de translocation (McRobbie *et al.*, 2012).

Aussi, les hélicases utilisent l'ATP pour leur activité sur les brins d'ADN (McRobbie *et al.*, 2012). Chez les bactéries, trois hélicases sont capables de faciliter la progression de la réplication en supprimant les sites de blocages sur l'ADN (Boubakri *et al.*, 2010). Ces trois enzymes sont notamment: DinG, Rep et UvrD.

1.2.6.1 L'hélicase DinG

L'hélicase DinG (*Damage inducible gene G*) appartient à la superfamille 2 (SF2) (McRobbie *et al.*, 2012; Voloshin *et al.*, 2007). L'hélicase DinG existe sous forme de monomère (McRobbie *et al.*, 2012; Voloshin *et al.*, 2003). C'est une hélicase de polarité 5' → 3'. Elle agit sur l'ADN simple brin avec une extrémité 5' (Rudolf *et al.*, 2006; Voloshin *et al.*, 2003). Le gène *dinG* a été découvert chez *E. coli* lors d'un dépistage génétique en réponse aux dommages de l'ADN (Lewis *et al.*, 1992).

L'hélicase DinG possède un site d'attachement au FeS qui est nécessaire à son activité enzymatique (McRobbie *et al.*, 2012; Ren *et al.*, 2009). Des études ont montré qu'en absence de ce site de liaison FeS, l'hélicase perdait son activité (Ren *et al.*, 2009; Rudolf *et al.*, 2006).

De plus, DinG possède un résidu cystéine nécessaire au domaine de liaison au FeS (McRobbie *et al.*, 2012). Plusieurs rôles lui ont été attribués car elle peut avoir comme substrat l'ADN et l'ARN (Boubakri *et al.*, 2010; McRobbie *et al.*, 2012). Notamment, l'hélicase DinG est impliquée dans la réponse aux dommages de l'ADN, la réponse SOS (Courcelle *et al.*, 2001; Lewis *et al.*, 1992). DinG joue aussi un rôle dans la recombinaison. Il a été montré que l'hélicase DinG peut supprimer les D-loops. Les D-loops sont des structures formées de trois brins d'ADN : deux des brins sont hybridés entre eux et l'autre est simple brin. Ces D-loops sont capables de mimer les intermédiaires de la recombinaison homologue. Elle peut donc enlever ces faux intermédiaires de recombinaison et réparer la recombinaison (McRobbie *et al.*, 2012; Voloshin *et al.*, 2007). L'autre rôle encore plus important désigné pour l'hélicase DinG est sa capacité à supprimer les hybrides ARN-ADN (R-loops) qui se forment lors de la transcription (Boubakri *et al.*, 2010). DinG est capable d'enlever l'ARN polymérase et permettre le redémarrage de la réplication (Boubakri *et al.*, 2010; McRobbie *et al.*, 2012).

L'hélicase DinG est liée aux hélicases XPD1/BACH1 humaines, CHL1/RAD3 de *Saccharomyces cerevisiae* ou encore Rad15 de *Schizosaccharomyces pombe* (Koonin, 1993; Liu *et al.*, 2008; Voloshin *et*

al., 2007). Le rôle de l'hélicase DinG n'est pas très clair. Même si sa polarité est semblable à celle de certaines hélicases dont la fonction est connue, force est de constater que DinG ne remplit pas ces mêmes fonctions (McRobbie *et al.*, 2012).

1.2.6.2 L'hélicase Rep

L'hélicase Rep appartient à la superfamille 1 des hélicases chez *E. coli* (Petit *et al.*, 2002). L'hélicase Rep est une hélicase répllicative homologue à la protéine Sr2 de la levure (Boubakri *et al.*, 2010; Flores *et al.*, 2004; Veaute *et al.*, 2005). Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, la protéine Sr2 joue un rôle dans la stabilité du génome (Flores *et al.*, 2004). De plus, l'hélicase Rep présente 40% de similitude en acides aminés avec l'hélicase UvrD (Petit *et al.*, 2002; Veaute *et al.*, 2005).

Rep pourrait jouer plusieurs rôles dans les processus cellulaires comme la progression des fourches de réplication, le redémarrage de la réplication ou encore la réparation de l'ADN (Denhardt *et al.*, 1967; Kline *et al.*, 2005). L'hélicase Rep aide à réparer les lésions de l'ADN causées par des expositions aux rayons ultraviolets (Denhardt *et al.*, 1967; Kline *et al.*, 2005).

Les mutants dépourvus de l'hélicase Rep présentent une incapacité à réparer l'ADN (Kline *et al.*, 2005). Cette hélicase semble également être impliquée dans la réponse au stress oxydatif (Bredeche *et al.*, 2001; Kline *et al.*, 2005). La nécessité de sa présence a été révélée dans le phénomène de conjugaison chez *E. coli*.

Les évidences ont montré qu'en absence de Rep chez la souche réceptrice, il y avait une réduction de la fréquence de conjugaison (Denhardt *et al.*, 1967; Kline *et al.*, 2005). Toujours chez *E. coli*, l'hélicase Rep participerait aussi au processus de recombinaison (Denhardt *et al.*, 1967; Kline *et al.*, 2005) mais son rôle semble moins efficace que celui de l'hélicase UvrD (Veaute *et al.*, 2005). L'hélicase Rep est également impliquée dans la réplication chromosomique (Kline *et al.*, 2005; Lane *et al.*, 1974). Des études ont montré que les mutants *rep* présentaient une réplication deux fois plus lente qu'une souche Rep sauvage (Veaute *et al.*, 2005). Ce ralentissement de la réplication peut conduire à des dommages au niveau des brins d'ADN comme des cassures fréquentes. Tout ceci peut mener à une induction de la réponse SOS (O'Reilly *et al.*, 2004; Ossanna *et al.*, 1989; Uzest *et al.*, 1995). En somme, l'hélicase Rep est très active dans toutes les activités de la cellule. Mais c'est son rôle dans la réplication qui sera encore plus intéressant à comprendre dans le mutant *topA*.

1.2.6.3 L'hélicase UvrD

L'hélicase UvrD, appelée aussi l'hélicase II, appartient à la superfamille 1A des hélicases (SF1A) chez *E. coli* (Petit *et al.*, 2002; Tomko *et al.*, 2010). Son activité d'hélicase n'est fonctionnelle que lorsqu'elle est sous forme dimérique (Flores *et al.*, 2004; Maluf *et al.*, 2003). Tout comme l'hélicase Rep, l'hélicase UvrD est homologue à l'hélicase Srs2 présente chez la levure (Boubakri *et al.*, 2010; Veaute *et al.*, 2005). De plus, les hélicases Rep et UvrD sont semblables au niveau structurel (Tomko *et al.*, 2010).

Contrairement à l'hélicase DinG, l'hélicase UvrD permet la translocation de l'ADN simple brin selon la polarité 3' → 5' (Flores *et al.*, 2004; Matson, 1989). L'hélicase UvrD est aussi capable de supprimer les R-loops (Flores *et al.*, 2004; Matson, 1989). Cette hélicase est essentielle à la réparation par excision des nucléotides (NER) (Boubakri *et al.*, 2010). De plus, UvrD joue aussi un rôle dans la réparation des mésappariements en supprimant le fragment d'ADN contenant le nucléotide erroné (Boubakri *et al.*, 2010). Cette hélicase joue également un rôle majeur dans la recombinaison homologue. Elle enlève les intermédiaires de recombinaison qui peuvent empêcher la progression des fourches de réplication (Veaute *et al.*, 2005).

Des études ont montré que chez des mutants *uvrD*, la recombinaison homologue est beaucoup augmentée (Bierne *et al.*, 1997a; Zieg *et al.*, 1978) en comparaison aux souches *uvrD* sauvages où la recombinaison est moindre (Veaute *et al.*, 2005). Cette augmentation de la recombinaison pourrait suggérer qu'il y a de nombreux problèmes lors de la réplication (Bierne *et al.*, 1997b; Flores *et al.*, 2001). L'hélicase UvrD semble donc être impliquée indirectement dans la réplication de l'ADN. Elle va aussi intervenir dans le redémarrage de la réplication (Flores *et al.*, 2004; Flores *et al.*, 2005). En stimulant l'ADN polymérase, UvrD va accroître la synthèse de l'ADN et ainsi favoriser la réplication (Flores *et al.*, 2004).

Chez des mutants *rep*, l'hélicase UvrD permet la survie de ces cellules (Flores *et al.*, 2004) car elle peut remplacer l'hélicase Rep (De Septenville *et al.*, 2012). Chez *E. coli*, le double mutant *rep uvrD* est donc léthal (Baharoglu *et al.*, 2010; De Septenville *et al.*, 2012) et cette létalité est supprimée par des mutations affectant les intermédiaires de recombinaison (Petit *et al.*, 2002; Vaute *et al.*, 2005). En effet, les mutations affectant la voie de recombinaison RecFOR suppriment les défauts de croissance du double mutant *rep uvrD* (Baharoglu *et al.*, 2010; Petit *et al.*, 2002).

UvrD participe à la réparation des lésions causées par les rayons Ultraviolets (UV) (Orren *et al.*, 1992; Veaute *et al.*, 2005).

1.2.6.4 **Activité des hélicases sur les R-loops**

Les R-loops sont des obstacles à l'avancement des fourches de réplication. Il a été montré que les hélicases pouvaient supprimer cet obstacle. La principale hélicase à qui cette fonction a été attribuée est l'hélicase DinG. En effet des études ont montré que chez des mutants *dinG*, la surexpression de la RNaseHI aide à la croissance. Comme la RNaseHI cible les R-loops, le rôle de l'hélicase DinG est d'agir négativement sur la formation des R-loops (Boubakri *et al.*, 2010). Contrairement à l'hélicase DinG, les hélicases Rep et UvrD ont moins d'efficacité sur les R-loops *in vivo* (Boubakri *et al.*, 2010).

1.2.6.5 **Activité des hélicases sur l'ARN polymérase**

L'activité des hélicases DinG, Rep et UvrD tourne autour d'une même cible qu'est l'ARN polymérase. Malgré leurs diverses et multitudes fonctions, ces trois hélicases travaillent ensemble sur l'activité de l'ARN polymérase pour permettre le bon déroulement de la réplication lors des collisions entre réplication et transcription (Boubakri *et al.*, 2010).

L'ARN polymérase est un l'obstacle majeur à la réplication chez le mutant *rep* (De Septenville *et al.*, 2012). En absence de l'hélicase Rep, l'hélicase UvrD prend le contrôle pour assurer la viabilité chez *E. coli* (Baharoglu *et al.*, 2010). En absence simultanée des hélicases Rep et UvrD, ce sont des mutations dans les ARN polymérases qui assurent la viabilité des doubles mutants *rep uvrD* (Baharoglu *et al.*, 2010). Les trois hélicases DinG, Rep et UvrD vont intervenir au niveau de la collision entre la réplication et la transcription dans le but de réparer les fourches bloquées (Boubakri *et al.*, 2010; De Septenville *et al.*, 2012). Il a été montré que l'hélicase DinG, en plus de supprimer les R-loops, pouvait déloger l'ARN polymérase au niveau des fourches de réplication bloquées (Baharoglu *et al.*, 2010; Boubakri *et al.*, 2010).

Cette hélicase peut aider la croissance des doubles mutants *rep uvrD*. Les mutations affectant l'ARN polymérase peuvent également aider la croissance des doubles mutants *rep uvrD* (Baharoglu *et al.*, 2010).

1.3 Objectif du projet

Mon projet vise à apporter davantage d'évidences expérimentales pour un rôle de la topoisomérase I dans la stabilité du génome chez *E. coli*. D'après toutes les données sur les hélicases DinG, Rep et UvrD, on pourrait s'attendre à ce qu'elles puissent aider les mutants *topA* en éliminant les R-loops ou l'ARN polymérase. Dans ce contexte, le but de mon projet est de tester la capacité de ces différentes hélicases à corriger les défauts de ségrégation des chromosomes et de croissance d'un mutant *topA*. Mon hypothèse est que les R-loops favorisent l'hyper-recombinaison en bloquant les fourches de réplication. En éliminant ces R-loops ou les ARN polymérases bloquées par ces R-loops, les hélicases DinG, Rep et UvrD pourraient empêcher l'hyper-recombinaison, permettant ainsi la ségrégation des chromosomes et la croissance de mutants *topA*.

2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

Tableau 1 : Souches d'*E. coli* utilisées et construites pour ce projet

Souches	Génotype	Source
JW 0784	$\Delta(araD-araB)567$, $\Delta lacZ4787(::rrnB-3)$, λ -, $\Delta dinG771 ::kan$, $rph-1$, $\Delta(rhaD-rhaB)568$, $hsdR514$	Keio Collection
JW 3786	$\Delta(araD-araB)567$, $\Delta lacZ4787(::rrnB-3)$, λ , $rph-1$, $\Delta uvrD769 ::kan$, $\Delta(rhaD-rhaB)568$, $hsdR514$	Keio Collection
JW 5604	$\Delta(araD-araB)567$, $\Delta lacZ4787(::rrnB-3)$, λ , $rph-1$, $\Delta rep-729 ::kan$, $\Delta(rhaD-rhaB)568$, $hsdR514$	Keio Collection
RFM 475	$rpsL$ $galK2$, $gyrB221(cou^R)$ $gyrB203(Ts)$ $\Delta(topA$ $cysB)204$ $\Delta lac74$	Drolet et al. (1995)
RFM 445	$rpsL$ $galK2$ $gyrB221(cou^R)$ $gyrB203(Ts)$ $\Delta lac74$	Drolet et al. (1995)
RFM 443	$rpsL$ $galK2$, $\Delta lac74$	Drolet et al. (1995)
NC 183	RFM 475 $\Delta(araD-araB)567$, $\Delta lacZ4787(::rrnB-3)$, λ , $rph-1$, $\Delta rep-729 ::kan$, $\Delta(rhaD-rhaB)568$, $hsdR514$	Ce travail

NC 184	Génotype identique à NC 183	Ce travail
NC 188	RFM 475 $\Delta(araD-araB)567$, $\Delta lacZ4787 (::rrnB-3)$, λ , <i>rph-1</i> , $\Delta uvrD769 ::kan$, $\Delta(rhaD-rhaB)568$, <i>hsdR514</i>	Ce travail
NC 189	Génotype identique à NC 188	Ce travail
NC 194	RFM 443 $\Delta(araD-araB)567$, $\Delta lacZ4787 (::rrnB-3)$, λ , <i>rph-1</i> , $\Delta rep-729 ::kan$, $\Delta(rhaD-rhaB)568$, <i>hsdR514</i>	Ce travail
NC 198	RFM 443 $\Delta(araD-araB)567$, $\Delta lacZ4787 (::rrnB-3)$, λ , <i>rph-1</i> , $\Delta uvrD769 ::kan$, $\Delta(rhaD-rhaB)568$, <i>hsdR514</i>	Ce travail
NC 204	RFM445 $\Delta(araD-araB)567$, $\Delta lacZ4787 (::rrnB-3)$, λ , <i>rph-1</i> , $\Delta rep-729 ::kan$, $\Delta(rhaD-rhaB)568$, <i>hsdR514</i>	Ce travail
NC 207	RFM 445 $\Delta(araD-araB)567$, $\Delta lacZ4787 (::rrnB-3)$, λ , <i>rph-1</i> , $\Delta uvrD769 ::kan$, $\Delta(rhaD-rhaB)568$, <i>hsdR514</i>	Ce travail
NC 210	RFM 443 $\Delta(araD-araB)567$, $\Delta lacZ4787 (::rrnB-3)$, λ -, $\Delta dinG771 ::kan$, <i>rph-1</i> , $\Delta(rhaD-rhaB)568$, <i>hsdR514</i>	Ce travail

NC 216	RFM 445 $\Delta(\text{araD-araB})567$, $\Delta\text{lacZ4787} (::\text{rrnB-3})$, Ce travail λ -, $\Delta\text{dinG771} ::\text{kan}$, <i>rph-1</i> , $\Delta(\text{rhaD-rhaB})568$, <i>hsdR514</i>	
NC 248	RFM 475 $\Delta(\text{araD-araB})567$, $\Delta\text{lacZ4787} (::\text{rrnB-3})$, Ce travail λ -, $\Delta\text{dinG771} ::\text{kan}$, <i>rph-1</i> , $\Delta(\text{rhaD-rhaB})568$, <i>hsdR514</i>	
NC 253	Génotype identique à NC 248	Ce travail
NC 270	RFM 475 $\Delta(\text{araD-araB})567$, $\Delta\text{lacZ4787} (::\text{rrnB-3})$, Ce travail λ , <i>rph-1</i> , $\Delta\text{rep-729} ::\text{kan}$, $\Delta(\text{rhaD-rhaB})568$, <i>hsdR514</i> , pSK760	
NC 272	RFM 475 $\Delta(\text{araD-araB})567$, $\Delta\text{lacZ4787} (::\text{rrnB-3})$, Ce travail λ , <i>rph-1</i> , $\Delta\text{rep-729} ::\text{kan}$, $\Delta(\text{rhaD-rhaB})568$, <i>hsdR514</i> , pSK762C	
NC 274	RFM 475 $\Delta(\text{araD-araB})567$, $\Delta\text{lacZ4787} (::\text{rrnB-3})$, Ce travail λ , <i>rph-1</i> , $\Delta\text{uvrD769} ::\text{kan}$, $\Delta(\text{rhaD-rhaB})568$, <i>hsdR514</i> , pSK760	
NC 276	RFM 475 $\Delta(\text{araD-araB})567$, $\Delta\text{lacZ4787} (::\text{rrnB-3})$, Ce travail λ , <i>rph-1</i> , $\Delta\text{uvrD769} ::\text{kan}$, $\Delta(\text{rhaD-rhaB})568$, <i>hsdR514</i> , pSK762C	
NC278	RFM 475 $\Delta(\text{araD-araB})567$, $\Delta\text{lacZ4787} (::\text{rrnB-3})$, Ce travail	

λ -, Δ *dinG771* ::*kan*, *rph-1*, Δ (*rhaD-rhaB*)568,
hsdR514, pSK760

NC 280 RFM 475 Δ (*araD-araB*)567, Δ *lacZ4787*(::*rrnB-3*), Ce travail

λ -, Δ *dinG771* ::*kan*, *rph-1*, Δ (*rhaD-rhaB*)568,
hsdR514, pSK762C

VU 282 RFM 475, pSK760

VU 284 RFM 475, pSK762C

Tableau 2 : Milieux de cultures et préparations utilisées

Milieu	Composition
* LB solide (pour un 1L)	Agar 15 g Tryptone 10 g Extraits de levures 5 g NaCl 5 g Antibiotique, optionnel Acides aminés, optionnel
*M9 solide (pour 1L)	Agar 15 g Sels M9 5X 200 mL MgSO ₄ 1M 2 mL CaCl ₂ 1M 0,1 mL Glucose 20% 20 mL Antibiotique, optionnel Acides aminés, optionnel

***VB casa solide (pour 1L)** Agar 15 g
Sels VB 50X 20 mL
Glucose 20% 10 mL
Casamino acids 20% 5 mL
Antibiotique, optionnel
Acides amines, optionnel

Sels M9 5X (pour 1L) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 64 g
 KH_2PO_4 15 g
NaCl 2.5 g
 NH_4Cl 5 g

Sels VB 50X (pour 1L) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 g
Acide citrique 100 g
 K_2HPO_4 500 g
 $\text{NaNH}_4\text{HPO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 177 g

*Pour un milieu liquide, il faut ajouter tous les ingrédients sauf l'agar.

Plasmides utilisés :

Les plasmides pSK760 et pSK762C ont été introduits dans les différentes souches NC270($\Delta(topAcysB)204,\Delta rep-729,pSK760$), NC272($\Delta(topAcysB)204,\Delta rep-729,pSK762C$), NC274($\Delta(topAcysB)204,\Delta uvrD769,pSK760$), NC276($\Delta(topAcysB)204,\Delta uvrD769,pSK762C$), NC278($\Delta(topAcysB)204,\Delta dinG771,pSK760$), NC280($\Delta(topAcysB)204,\Delta dinG771,pSK762C$), dérivées de RFM475. Le plasmide pSK760 est un plasmide dérivé du plasmide pBR322 portant le gène *rnhA* sauvage. Le plasmide pSK762C est dérivé du plasmide pSK760 et possède un gène *rnhA* inactif (Bockrath *et al.*, 1987). Les plasmides pSK760 et pSK762C contiennent le gène de résistance à l'ampicilline.

Technique de *spot assay* (test de spot)

Les cellules ont été prélevées à partir du stock de glycérol. Elles ont été remises en suspension dans 500 μ L de milieu LB. Le mélange est vortexé et les cellules ont été dosées au spectrophotomètre pour obtenir une densité optique précise ($D.O_{600nm}$) de 0,6.

Une fois la densité optique obtenue, une série de dilutions située entre 10^{-1} à 10^{-5} a été faite à partir de la suspension à $D.O_{600nm}$ égale à 0.6. Un volume de $5\mu L$ de chacune des dilutions a été déposé sur le milieu gélosé approprié. Les dilutions sériées ont été déposées de la suspension non-diluée ($D.O_{600nm}$ 0,6) à la suspension diluée de 10^{-5} . Le test de spot a été fait sur milieu LB aux incubations 24, 30 et $37^{\circ}C$. La croissance a été évaluée après 24, 48 ou 104 heures.

Construction des souches à l'étude :

Les souches d'*E. coli* employées pour cette étude sont dérivées des souches RFM 475, RFM 445 et RFM 443. Leurs caractéristiques sont détaillées dans le tableau 1. Parmi les souches dérivées de RFM475, il y a NC183/NC184 (mutants $\Delta(topAcysB)204, \Delta rep-729$), NC 188/NC189 (mutants $\Delta(topAcysB)204, \Delta uvrD769$), NC248/NC253 (mutants $\Delta(topAcysB)204, \Delta dinG771$). Les souches dérivées de RFM445 comprennent : NC204 ($gyrB203(Ts), \Delta rep-729$), NC207 ($gyrB203(Ts), \Delta uvrD769$) et NC216 ($gyrB203(Ts), \Delta dinG771$).

À partir de la souche RFM 443, les souches NC194 (RFM443 $\Delta rep-729$), NC198 (RFM443 $\Delta uvrD769$) et NC210 (RFM 443 $\Delta dinG771$) ont été construites. Toutes ces souches ont été construites transduction avec le phage P1 $_{vir}$.

Les différents lysats phagiques proviennent des souches JW 0784, JW 3786, JW 5604 portant respectivement les délétions $\Delta dinG771$, $\Delta uvrD769$ et $\Delta rep-729$, toutes avec un marqueur *kan^r* inséré à la place du gène délété. Les souches receveuses sont RFM 475, RFM 445 et RFM 443. Les transductants obtenus ont été sélectionnés sur milieu contenant de la kanamycine (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). La présence des mutations Δrep , $\Delta uvrD$ et $\Delta dinG$ a été vérifiée par PCR en utilisant les oligonucléotides appropriés : REP1 d(CCGCAGCCAACCGGTTAG)/REP2 d(GCCGGATGCGATGCTGAC), UVRD1 d(CGGTTGGCATCTCTGACC) UVRD2 d(GAAGATGGCGCAGATGCC), DING1 d(CCGTAGTCATCGCTGGTG)/DING2 d(CGGTCTAAATCGCGCGCG).

Les oligonucléotides KT1 et KT2 ont été aussi utilisés pour vérifier et confirmer la présence du gène de résistance à la kanamycine. Pour être certaine que le gène de résistance à l'antibiotique est associé à la mutation introduite, la confirmation par PCR s'est aussi réalisée en utilisant l'amorce KT1 pour la kanamycine et les amorces REP1, UVRD1 et DING1.

Pour le maintien des plasmides pSK760 dans les souches NC 270, NC 274, NC 278 et du plasmide pSK762C dans les souches NC 272, NC 276, NC 280, l'ampicilline (50 µg/mL) est ajoutée au milieu. De plus, pour la croissance de toutes les souches dérivées de RFM 475, la cystéine (0.05%) est aussi ajoutée au milieu parce que la souche RFM 475 possède une délétion du gène *cysB* suite à la délétion du gène *topA*.

Milieux et conditions de croissance :

Les souches ont été obtenues sur du milieu minimal VB casa (Vogel-Bonner) supplémenté en casaminos acids (20%). Pour la sélection de nos souches construites, la kanamycine a été ajoutée dans le milieu pour une concentration finale de 50 µg/mL.

L'obtention des différentes souches à l'étude sur milieu minimal résulte de la difficulté à maintenir les doubles mutations sur milieu riche LB. Les transductants ont été obtenus à 37°C. Les tests de spot ont été réalisés sur milieu LB supplémenté en cystéine (50 µg/mL) à trois températures différentes : 24, 30 et 37°C.

Transformation par choc thermique

Les plasmides pSK760 et pSK762C ont été introduits dans les souches $\Delta(\text{topAcysB})204, \Delta\text{rep-729}$ (NC 183), $\Delta(\text{topAcysB})204, \Delta\text{uvrD769}$ (NC 188), $\Delta(\text{topAcysB})204, \Delta\text{dinG771}$ (NC 248), $\Delta(\text{topAcysB})204$ (RFM 475). Les souches à l'étude ont été cultivées durant la nuit en milieu minimal M9 supplémenté en cystéine (50 $\mu\text{g/mL}$) et en kanamycine (50 $\mu\text{g/mL}$) et incubées à 37°C. Après croissance durant la nuit, les cellules ont été diluées 1/50 dans 5mL de milieu LB et incubées à 37°C jusqu'à une densité optique (D.O.) de 0,6 (600nm). À la D.O. de 0,6, les cellules en phase exponentielle ont été transférées sur glace pour 15 minutes, puis centrifugées. Les cellules ont été resuspendues successivement dans 1mL et 200 μL de CaCl_2 (0.1 M) froid. Les cellules ont été gardées 30 minutes sur glace. Les cellules compétentes ont été réparties et mélangées séparément avec 5 μL de pSK760 ou de pSK762C. Les mélanges ont subi un choc thermique (42°C) et ont été déposés sur la glace.

Les différents mélanges ont été transférés dans du milieu LB et incubés une heure à 37°C (délai phénotypique). Les cellules ont été ensuite étalées sur un milieu LB supplémenté en cystéine (50 $\mu\text{g/mL}$), en kanamycine (50 $\mu\text{g/mL}$) et en ampicilline (50 $\mu\text{g/mL}$) et incubées à 37°C.

Les deux antibiotiques permettent la sélection des transformants $\Delta(topAcysB)204,\Delta rep-729, pSK760$ (NC270), $\Delta(topAcysB)204,\Delta rep-729,pSK762C$ (NC272), $\Delta(topAcysB)204,\Delta uvrD769,pSK760$ (NC274), $\Delta(topAcysB)204,\Delta uvrD769,pSK762C$ (NC 276), $\Delta(topAcysB)204,\Delta dinG771, pSK760$ (NC 278), $\Delta(topAcysB)204,\Delta dinG771, pSK762C$ (NC 280), $\Delta(topAcysB)204, pSK760$ (NC 282), $\Delta(topAcysB)204, pSK762C$ (NC 284).

Examen microscopique :

Pour évaluer l'importance des hélicases DinG, Rep et UvrD sur la morphologie cellulaire et la ségrégation des chromosomes de notre mutant *topA*, des cultures cellulaires d'une nuit («*overnight*») dans un milieu M9 glucose supplémenté de l'antibiotique kanamycine (50 µg/mL) ont été préparées. En plus de l'antibiotique, le même milieu a été supplémenté en acide aminé cystéine (50 µg/mL) pour les souches dérivées de RFM 475. La croissance a été réalisée à 30°C, pour les dérivés de RFM 445 et à 37°C, pour les dérivés de RFM 443 et RFM 475.

Après la croissance «*overnight*», les cellules ont été diluées en duplicata dans 35 mL de milieu LB et M9 préchauffés à 30°C ou à 37°C. La croissance des souches a été fait jusqu'à l'obtention d'une densité optique ($D.O_{600nm}$) d'environ 0,75. Lorsque la densité optique désirée est atteinte, 500 μ L de cellules ont été centrifugées et resuspendues dans de l'éthanol 77% (solution de fixation). Les cellules ont été lavées avec 500 μ L de 0.9% NaCl, centrifugées et resuspendues dans 100 μ L de 0.9% NaCl. Les cellules lavées ont été ensuite fixées sur une lame traitée à la poly-lysine et séchées à l'air libre à température ambiante. Un volume de 5 μ L de DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole) a été déposé sur les cellules fixées et le tout a été recouvert d'une lamelle pour observation au microscope à fluorescence. Les images de microscopie ont été obtenues avec un microscope à fluorescence E600 de Nikon à l'aide de l'objectif 100X à immersion.

3. RÉSULTATS

1. Analyse des doubles mutants *topAΔrep::km* obtenus par transduction: impact de l'inactivation de l'hélicase Rep sur la croissance et la ségrégation des chromosomes du mutant *topA*.

Des études ont déjà démontré que l'hélicase Rep joue un rôle dans la réplication. En effet, les mutants dépourvus de l'activité hélicase de Rep vont présenter une réplication deux fois plus lente. Cette réduction de la réplication pourrait être bénéfique chez le mutant *topA*, puisque celui-ci présente des défauts de croissance causés par un hypersurenroulement négatif. L'excès de surenroulement négatif, introduit par l'activité gyrasique, va maintenir l'ADN dans un état plus ouvert que l'état normal, ce qui pourrait favoriser davantage la réplication. Chez des souches ayant une topoisomérase I (*topA*) normale, ce surenroulement est supprimé (Usongo *et al.*, 2008). Sous cet angle, on a voulu déterminer l'effet de l'inactivation de l'hélicase Rep chez le mutant *topA* (**figure 7**). Tous les doubles mutants *topAΔrep::km* ont été construits par transduction et obtenus sur un milieu relativement pauvre (VB casa). Les transductants ont été sélectionnés avec de la kanamycine.

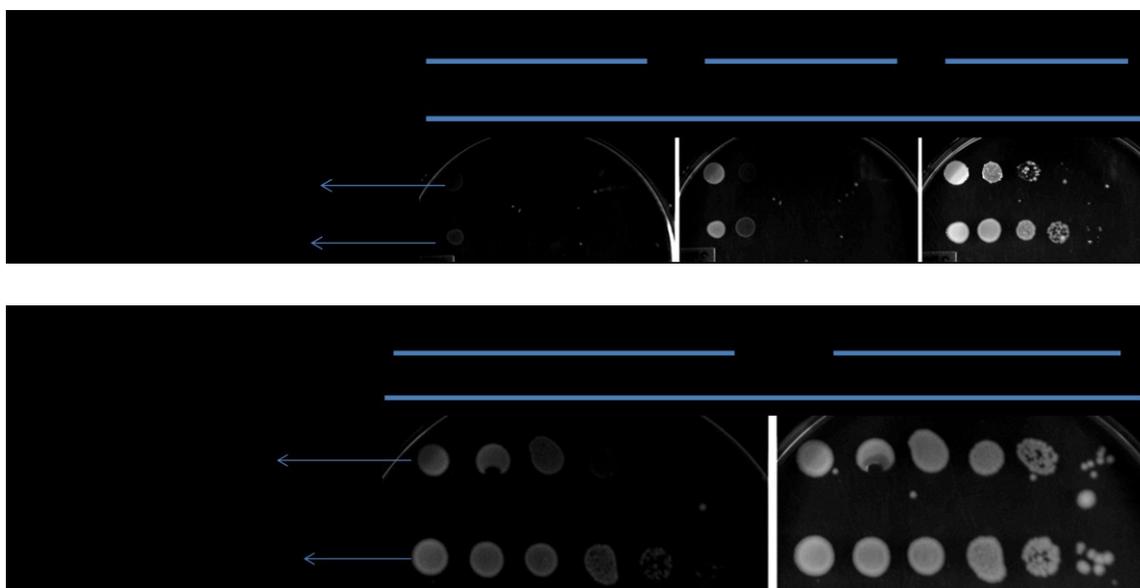
De plus, pour être certain que la souche a reçu le gène *rep* muté, une double confirmation par PCR a été réalisée. La première confirmation se fait avec les oligonucléotides pour la cassette de résistance à la kanamycine (kt1 et kt2). La seconde confirmation se fait avec un oligonucléotide Rep1 pour le gène *rep* et l'oligonucléotide kt1 pour la kanamycine. Cette double confirmation a permis d'éliminer les transductants faux positifs.

Pour évaluer l'impact de l'absence de Rep, une série de dilutions (test de spot) a été fait à partir d'une suspension de cellules des souches NC 183 (*topAΔrep ::km*) et la souche contrôle RFM 475 (*topA*) préalablement dosées à une D.O_{600nm} de 0.6. Les températures expérimentales étaient 24°C, 30°C et 37°C. Il a déjà été montré que le mutant *topA* était sensible aux basses températures et présentait des défauts de croissance. Ces défauts de croissance sont principalement causés par l'hypersurenroulement négatif (Baaklini *et al.*, 2008). Un volume de 5 µL provenant des différentes dilutions (10^{-1} à 10^{-5}) a été déposé sur le milieu LB supplémenté en cystéine (50µg/mL). La souche RFM 475 (*topA*) représente notre contrôle. L'analyse des résultats obtenus ont montré un impact positif de l'absence de l'hélicase Rep chez le mutant *topA* (**figure 7**). Cet impact est plus accentué aux basses températures de 24°C et 30°C. En effet, à la température de 24°C (**figure 7**), l'absence de Rep aide clairement la croissance du mutant *topA*.

Un effet positif est également noté à la température de 30°C (**Figure 7**). Le mutant *topA Δrep::km* pousse bien à 37°C,

Nous avons observé que des transductants *Δrep::km topA* étaient faciles à obtenir sur milieu minimal, ce qui laisse supposer que l'absence de Rep n'entraîne pas l'apparition de mutations compensatoires chez le mutant *topA*. Afin de supporter cette conclusion, nous avons testé (test de spot) un second transductant *Δrep::km topA* pour sa croissance à différentes températures. Comme prévu, les souches NC 183 (*topAΔrep::km*) et NC 184 (*topAΔrep::km*) poussent de façons identiques aux différentes températures expérimentales utilisées (**Figure 7**).

7.A.





7.B.

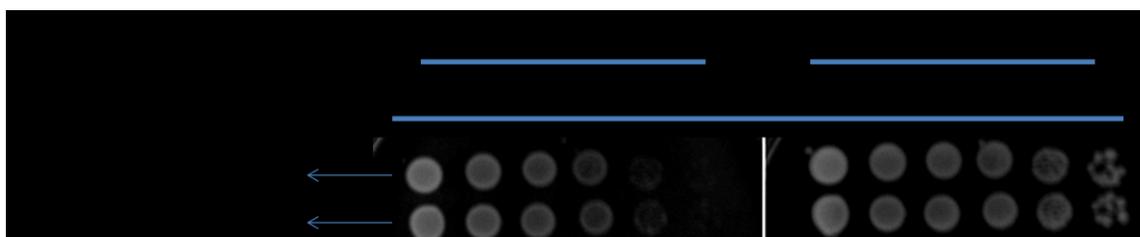


Figure 7 : Évaluation de la viabilité cellulaire en déposant un volume précis des dilutions en séries de cultures liquides (souches *topA Δrep::km* et contrôle *topA*). Effet de l'inactivation de l'hélicase Rep sur la croissance du mutant *topA* sur milieu LB solide supplémenté en cystéine (0.5%). Les souches *topA Δrep::km* à l'étude (NC 183, NC 184) et notre souche contrôle *topA* (RFM 475) ont été incubées à 24, 30 et 37°C pour le temps indiqué.

En parallèle, l'allèle $\Delta rep::km$ a été introduit dans la souche isogénique RFM 445 ($gyrB(Ts)$) pour voir si l'absence de Rep qui a pour effet de réduire la réplication, serait néfaste pour une souche avec une gyrase défectueuse. Comme le montrent les résultats de la **figure 8**, l'absence de Rep dans la souche $gyrB(Ts)$ a un effet très néfaste sur la croissance de cette dernière, particulièrement à 37°C. Ce résultat supporte l'idée que la réplication est altérée dans le mutant rep , car le mutant $gyrB(Ts)$ a déjà de la difficulté à répliquer son chromosome à la température semi-permissive de 37°C. Cet effet de l'absence de Rep pourrait donc expliquer l'effet positif de la délétion rep sur le mutant $topA$ qui sur-réplique son chromosome à basses températures.

Dans la prochaine expérience nous avons voulu tester l'effet de la surproduction de la RNaseHI sur la croissance du double mutant $\Delta rep::km topA$. Si la délétion de rep a un effet semblable à la surproduction de la RNaseHI, cette surproduction ne devrait pas stimuler la croissance de la souche $\Delta rep::km topA$. Nous avons donc introduit les plasmides pSK760 et pSK762C dans le double mutant $topA\Delta rep::km$ via la transformation par choc thermique. La même transformation a également été effectuée pour la souche contrôle $topA$. La **figure 9** montre l'effet de la surproduction de la RNaseHI chez le mutant $topA$ seul et le double mutant $topA\Delta rep::km$.

Les résultats (**figure 9**) obtenus montrent que la souche *topA Δrep::km pSK762C* (gène plasmidique *rnhA* muté; souche NC 272) pousse mieux que la souche *topA Δrep::km pSK760* (gène plasmidique *rnhA* sauvage; souche NC 270). Ce résultat montre que la surproduction de la RNaseHI nuit à la croissance du double mutant *topAΔrep::km*. Comme démontré précédemment, la surproduction de la RNaseHI stimule la croissance du mutant *topA* (pSK760 (NC 282) vs pSK762C (NC 284)).

L'étape suivante consistait à étudier l'effet de la délétion de *rep* sur la morphologie cellulaire et la distribution de l'ADN dans notre mutant *topA*, en utilisant la microscopie en contraste de phase et à fluorescence (ADN marqué au DAPI). Les souches NC 183 (*topA Δrep::km*) et RFM 475 (*topA*) ont été cultivées dans les mêmes conditions expérimentales que pour les tests de spot (évaluation de la viabilité cellulaire). Les cellules ont été recueillies pour la microscopie comme expliqué dans la section matériel et méthode. L'observation microscopique (**figure 10**) a révélé une légère mais réelle amélioration de la séparation de l'ADN dans le double mutant *topA Δrep::km* par rapport au mutant *topA*. Il est donc possible que la diminution de la réplication due à l'absence de Rep, facilite la ségrégation des chromosomes chez le mutant *topA*.



Figure 8 : Évaluation de la viabilité cellulaire en déposant un volume précis des dilutions en séries de cultures liquides. Effet de l'inactivation de l'hélicase Rep sur la croissance du mutant *gyrB(Ts)* en milieu LB. Les souches NC 204 (*gyrB(Ts) Δrep::km*) et RFM 445 (*gyrB(Ts)*) ont été incubées à 24, 30 et 37°C pour le temps indiqué.

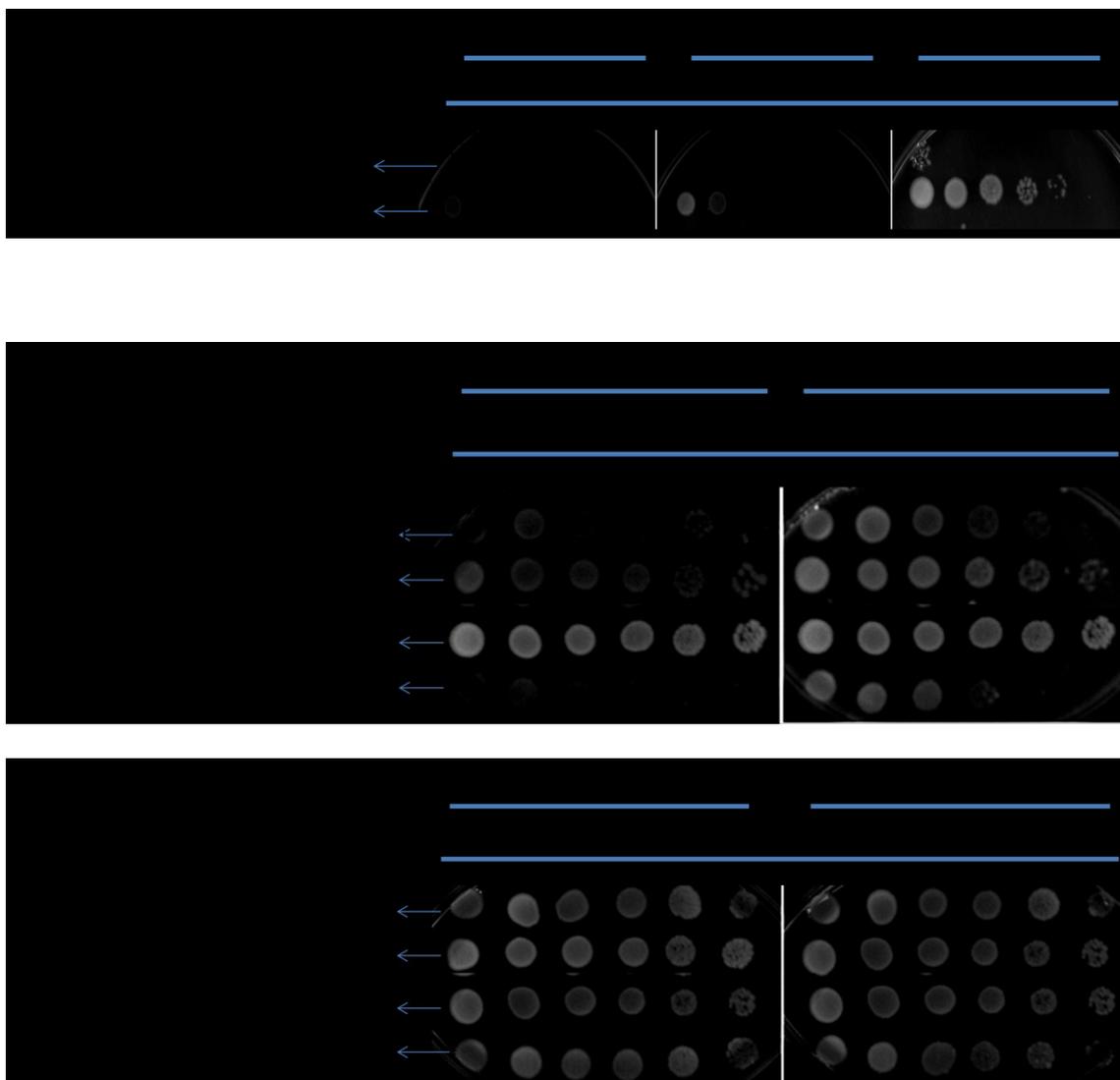


Figure 9 : Évaluation de la viabilité cellulaire en déposant un volume précis des dilutions en séries de cultures liquides. Effet de la surproduction de la RNaseHI sur la croissance du double mutant *topA Δrep::km* en milieu LB. Les souches *topA Δrep::km pSK760* (NC 270) et *topAΔrep::km pSK762C* (NC 272), de même que les souches contrôles *topA pSK760* et *topA pSK762C* ont été incubées à 24, 30 et 37°C pour le temps indiqué.

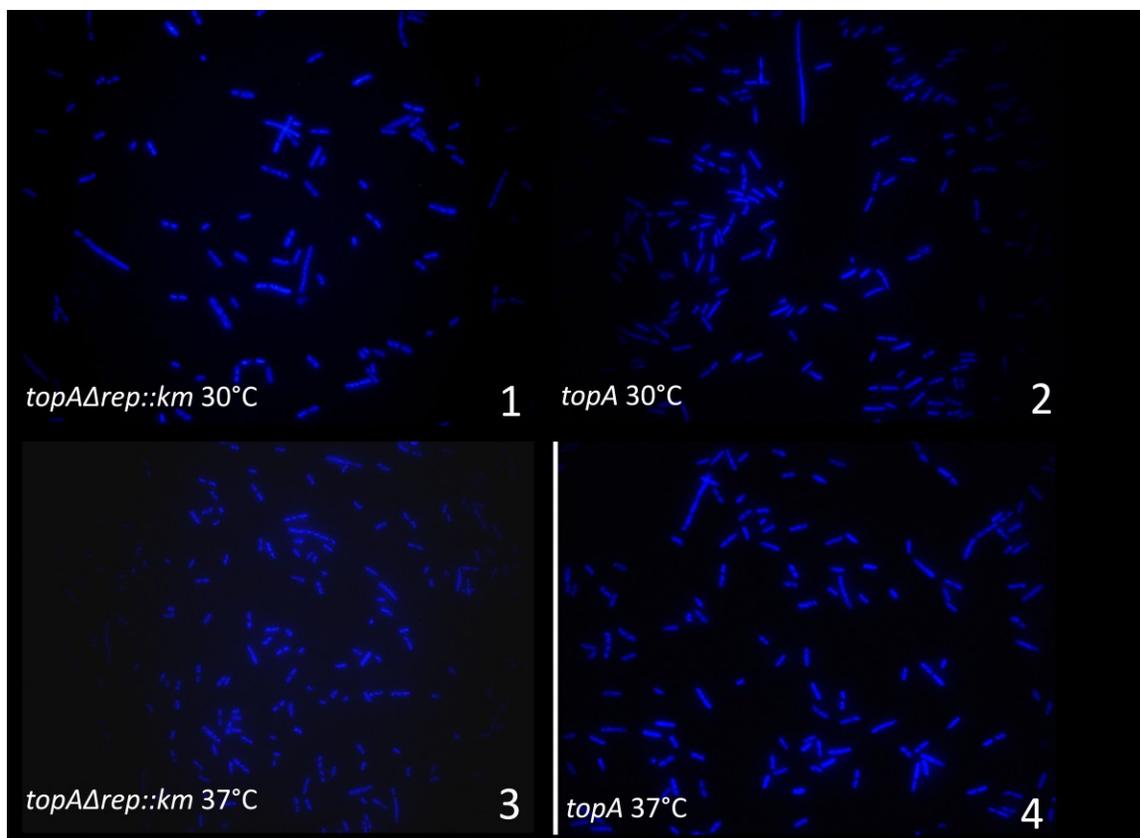


Figure 10 : Morphologie cellulaire et morphologie du chromosome des souches *topAΔrep::km* (NC 183) et *topA* (RFM 475). Les cellules ont été cultivées et préparées pour la microscopie comme décrit dans la section matériel et méthode. Les photos 1 et 3 sont des cellules colorées au DAPI du double mutant *topAΔrep::km* recueillies respectivement à 30°C et 37°C. Les photos 2 et 4 sont des cellules colorées du mutant *topA* seul (RFM 475) prélevées respectivement à 30°C et 37°C.

2. Analyse des doubles mutants *topAΔuvrD::km* obtenus par transduction : impact de l'inactivation de l'hélicase UvrD sur la croissance et la ségrégation des chromosomes du mutant *topA*.

La seconde partie de cette étude consistait à analyser l'effet de l'absence de l'hélicase UvrD chez le mutant *topA*. Cette hélicase peut enlever des obstacles sur l'ADN, mais peut également empêcher RecA de faire la recombinaison. La **figure 11** montre que l'inactivation de l'hélicase UvrD a un effet négatif sur la croissance du mutant *topA*. En effet, le double mutant *topA ΔuvrD::km* (NC 188) pousse mal aux températures de 24°C et 30°C.

Pour voir si les R-loops sont impliqués dans cette difficulté de croissance du mutant *topAΔuvrD::km*, les plasmides pSK760 (gène plasmidique *rnhA* sauvage) et pSK762C (gène plasmidique *rnhA* muté) ont été introduits dans le double mutant *topAΔuvrD::km* de même que dans la souche contrôle *topA* (RFM 475).

La **figure 12** montre que la surproduction de la RNaseHI n'a pas vraiment d'effet significatif sur la croissance du double mutant *topAΔuvrD::km*, lorsqu'on compare avec l'effet de cette surproduction sur la croissance du mutant *topA*.

Ces résultats démontrent que les R-loops ne sont pas liés aux défauts de croissance du double mutant *topA ΔuvrD::km*. La **figure 12** montre que les défauts de croissance du double mutant *topA ΔuvrD::km*, sont présents à 24 et 30°C, mais pas à 37°C. Cela laisse supposer que le défaut de croissance de cette souche est lié à l'absence de *topA* et non à la mutation *gyrB(Ts)*. Nous avons donc testé l'effet de la délétion *uvrD* sur la croissance du mutant *gyrB(Ts)* (**figure 13**). Comme prévu, l'inactivation de l'hélicase UvrD n'affecte pas la croissance du mutant *gyrB(Ts)* (*gyrB(Ts) ΔuvrD::km* (NC 207)). En effet, le double mutant pousse comme la souche contrôle RFM 445.

La morphologie cellulaire du double mutant *topAΔuvrD::km* a été observée en microscopie à fluorescence (**Figure 14**). Pour cette étape, nous avons voulu observer s'il y avait un défaut de division cellulaire chez ce mutant.

Le double mutant *topA* Δ *uvrD::km* forme de longs filaments et ce, indépendamment de la température (**Figure 14**). Il y a plus de cellules filamenteuse remplies d'ADN à 30°C que les quelques filaments présent à 37°C semblent plus longs. Afin de vérifier si la filamentation observée à 37°C serait due à la mutation *gyrB(Ts)*, nous avons construit une souche *gyrB(Ts)* Δ *uvrD::km* (NC 207).

La **figure 14** montre que le mutant *gyrB(Ts)* Δ *uvrD::km* forme beaucoup plus de très longs filaments à 37°C qu'à 30°C. Il est donc probable que la filamentation observée à 37°C dans nos souches Δ *uvrD::km* soit due à la mutation *gyrB(Ts)*, alors que la filamentation à 30°C, lorsque présente significativement, est due à l'absence du gène *topA* et corrèle avec une baisse de la viabilité cellulaire (tests de spot).

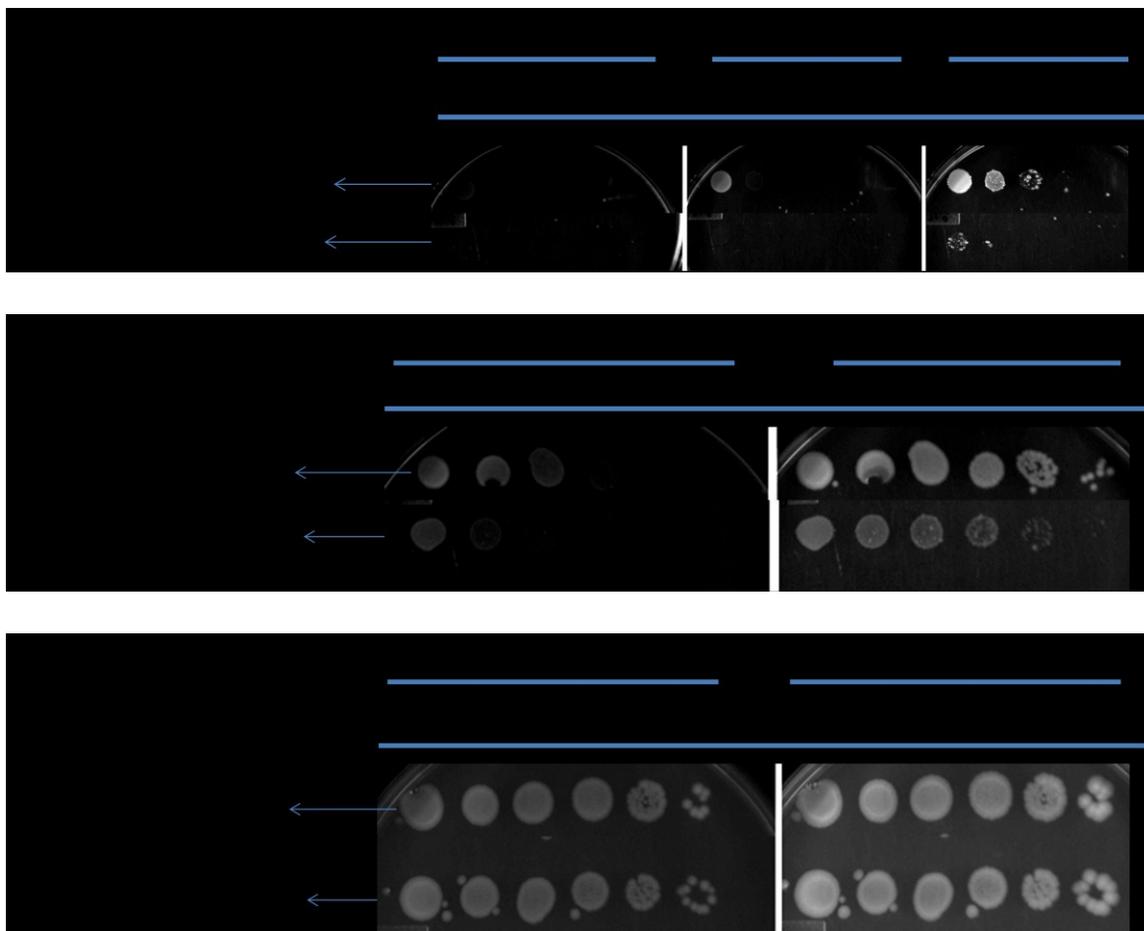


Figure 11 : Évaluation de la viabilité cellulaire en déposant un volume précis des dilutions en séries de cultures liquides. Effet de l'inactivation de l'hélicase UvrD sur la croissance du mutant *topA* sur milieu LB solide supplémenté en cystéine (0.5%). Les souches *topA* Δ *uvrD::km* à l'étude (NC 188) et notre souche contrôle *topA* (RFM 475) ont été incubées à 24, 30 et 37°C pour le temps indiqué.

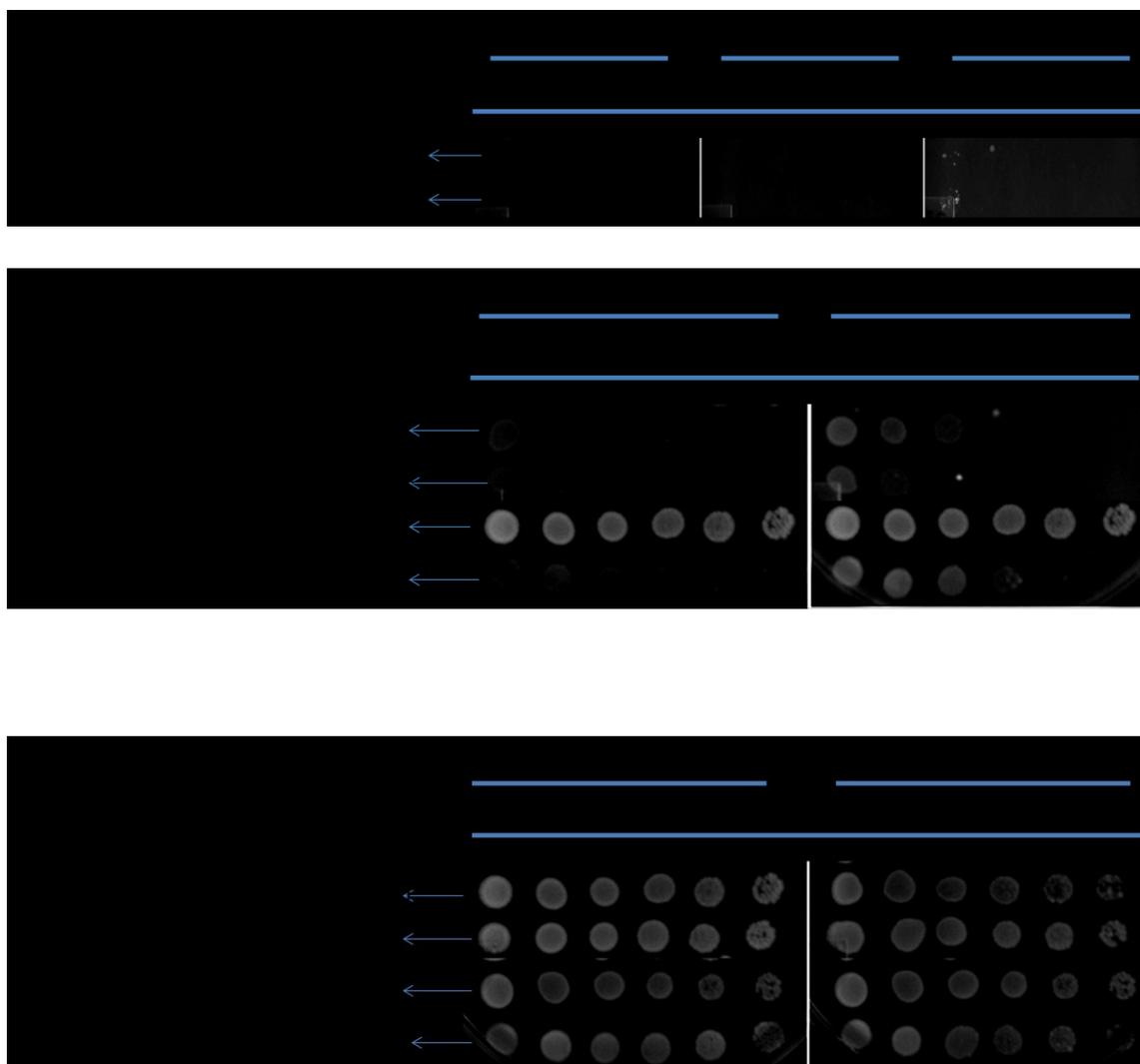


Figure 12 : Évaluation de la viabilité cellulaire en déposant un volume précis des dilutions en séries de cultures liquides. Effet de la surproduction de la RNaseHI sur la croissance du double mutant *topAΔuvrD::km* en milieu LB. Les souches *topAΔuvrD::km pSK760* (NC 274) et *topAΔuvrD::km pSK762C* (NC 276), de même que les souches contrôles *topA pSK760* et *topA pSK762C* ont été incubées à 24, 30 et 37°C pour le temps indiqué.



Figure 13 : Évaluation de la viabilité cellulaire en déposant un volume précis des dilutions en séries de cultures liquides. Effet de l'inactivation de l'hélicase UvrD sur la croissance du mutant *gyrB(Ts)* en milieu LB. Les souches NC 207 (*gyrB(Ts) ΔuvrD::km*) et RFM 445 (*gyrB(Ts)*) ont été incubées à 24, 30 et 37°C pour le temps indiqué.

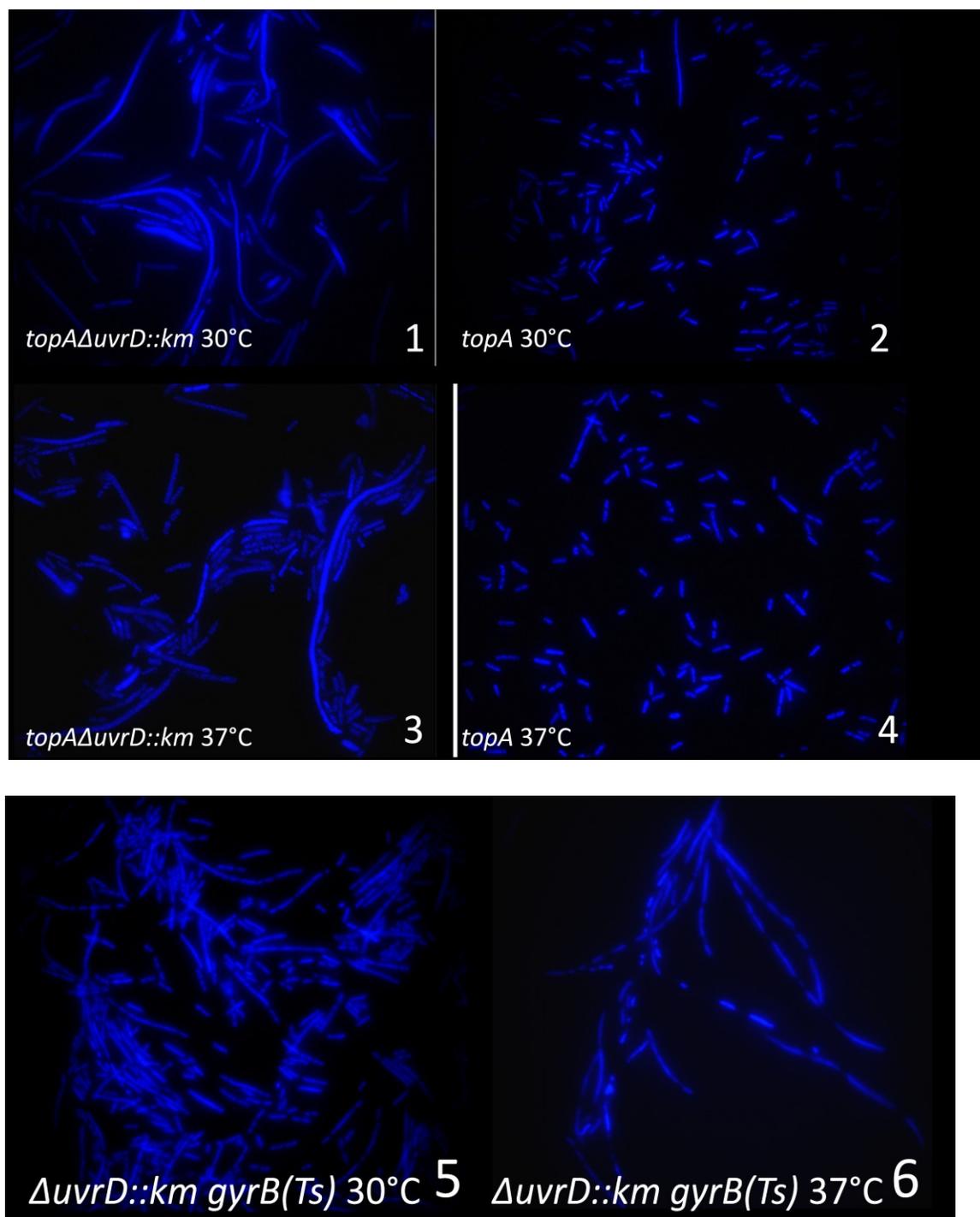


Figure 14 : Morphologie cellulaire et morphologie du chromosome de souches $\Delta uv r D:: k m$.

Les cellules ont été cultivées et préparées pour la microscopie comme décrit dans la section matériel et méthode. Les photos 1 et 3 sont des cellules colorées du double mutant *topAΔuvrD::km* (NC 188) recueillies respectivement à 30°C et 37°C. Les photos 2 et 4 sont des cellules colorées du mutant *topA* seul (RFM 475) prélevées respectivement à 30°C et 37°C. Enfin, les photos 5 et 6 sont des cellules colorées du mutant *gyrB*(Ts) *ΔuvrD::km* (NC 207) recueillies respectivement à 30°C et 37°C.

3. Analyse des doubles mutants *topAΔdinG::km* obtenus par transduction : Impact de l'inactivation de l'hélicase DinG au niveau de la croissance du mutant *topA*.

Dans la troisième partie de cette étude, nous avons voulu tester l'effet de l'absence de DinG, hélicase qui peut enlever des R-loops, sur la croissance de notre mutant *topA*. La **figure 15** montre que l'absence de l'hélicase DinG n'a aucun effet sur la croissance du double mutant *topAΔdinG::km* (NC 253) lorsque comparé avec la souche contrôle *topA* (RFM 475).

De plus, nous avons trouvé que la surproduction de la RNaseHI stimule la croissance de ces deux souches de la même manière (**figure 16**). Donc l'hélicase DinG ne semble pas jouer un rôle dans l'élimination des R-loops chez le mutant *topA*.

La **figure 17** montre que l'absence de l'hélicase DinG n'a aucun effet sur la morphologie cellulaire de notre mutant *topA*. Cependant, la morphologie de l'ADN de ces cellules suggère que l'absence de DinG semble améliorer la ségrégation des chromosomes dans le mutant *topA*.

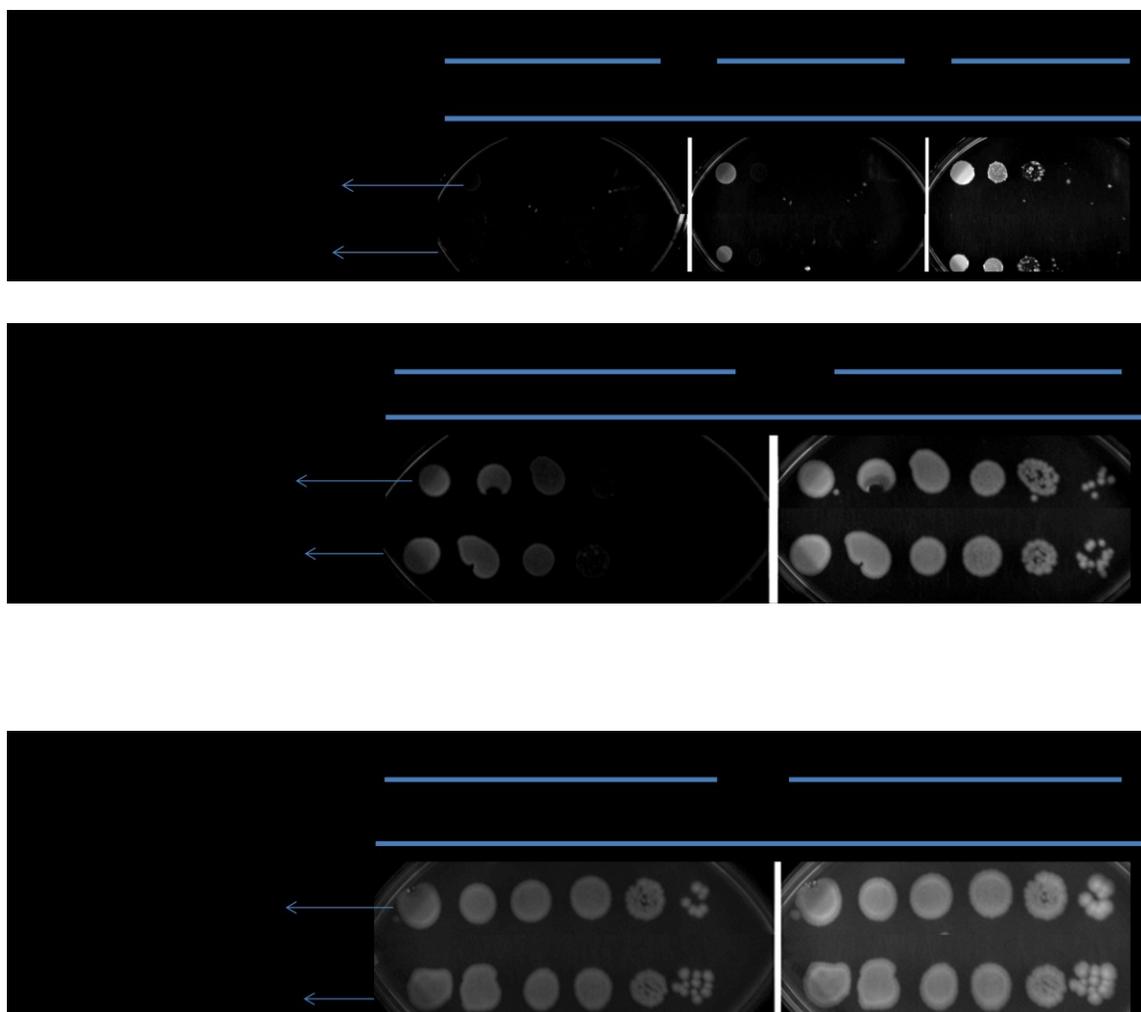


Figure 15: Évaluation de la viabilité cellulaire en déposant un volume précis des dilutions en séries de cultures liquides. Effet de l'inactivation de l'hélicase DinG sur la croissance du mutant *topA* sur milieu LB solide supplémenté en cystéine (0.5%). La souche *topAΔdinG::km* à l'étude (NC 253) et notre contrôle *topA* (RFM 475) ont été incubés à 24, 30 et 37°C pour le temps indiqué.



Figure 16 : Évaluation de la viabilité cellulaire en déposant un volume précis des dilutions en séries de cultures liquides. Effet de la surproduction de la RNaseHI sur la croissance du double mutant *topA ΔdinG::km* en milieu LB. Les souches *topA ΔdinG::km pSK760* (NC 278) et *topAΔdinG::km pSK762C* (NC 280), de même que les souches contrôles *topA pSK760* et *topA pSK762C* ont été incubées à 24, 30 et 37°C pour le temps indiqué.

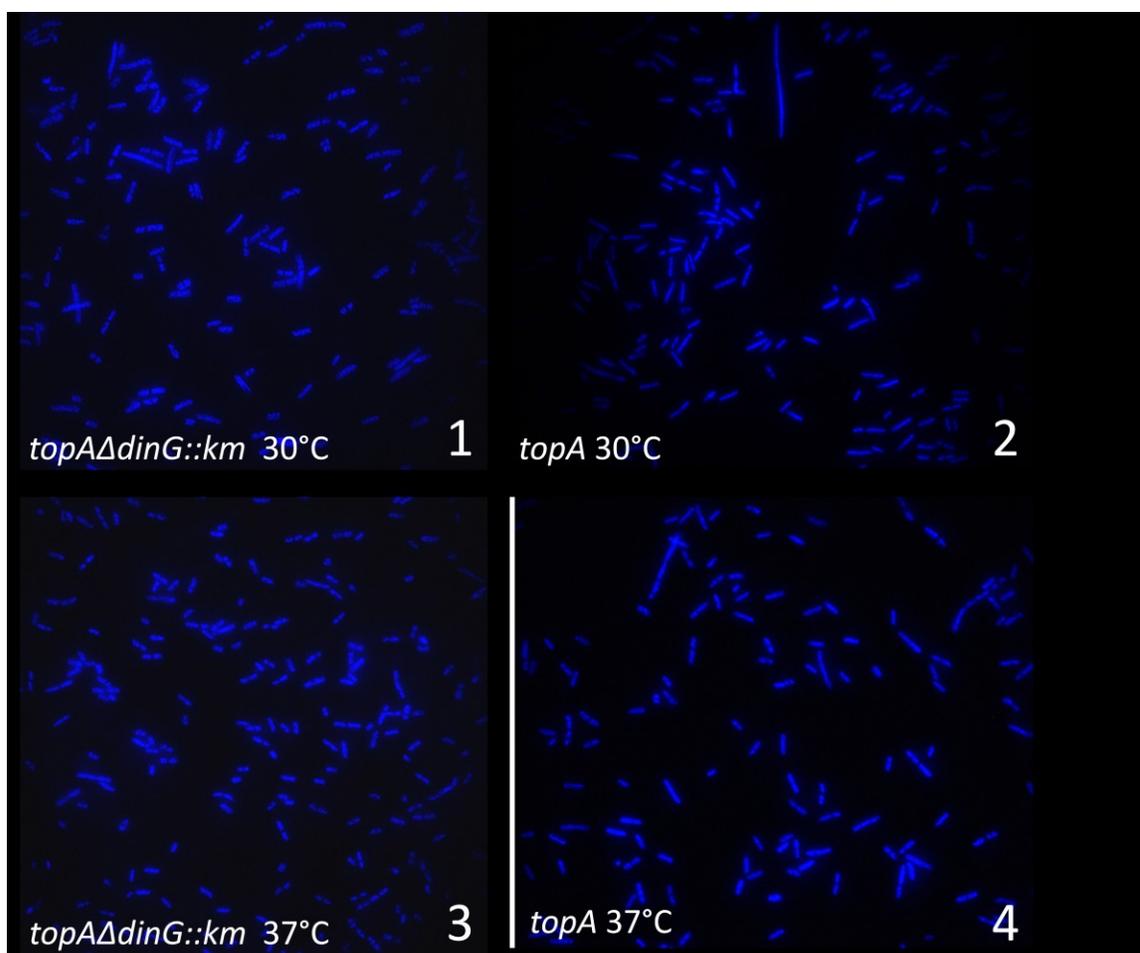


Figure 17 : Morphologie cellulaire et morphologie du chromosome des souches *topA ΔdinG::km* (NC 253) et *topA* (RFM 475). Les cellules ont été cultivées et préparées pour la microscopie comme décrit dans la section matériel et méthode. Les photos 1 et 3 sont des cellules colorées du double mutant *topAΔdinG::km* recueillies respectivement à 30°C et 37°C. Les photos 2 et 4 sont des cellules colorées du mutant *topA* seul (RFM 475) prélevées respectivement à 30°C et 37°C.

4. DISCUSSION

Ce travail fut initié suite à l'observation que les hélicases DinG, Rep et UvrD pouvaient enlever des obstacles à la réplication, tels que des R-loops (DinG) ou des ARN polymérase arrêtées (les 3 hélicases) (Boubakri *et al.*, 2010). Comme le mutant *topA* souffre en partie de l'accumulation de R-loops qui peuvent constituer des obstacles pour la transcription et la réplication, nous avons émis comme hypothèse que l'élimination d'une de ces hélicases pourrait affecter négativement la croissance du mutant *topA*. Les résultats obtenus ici ne sont pas compatibles avec cette hypothèse, et suggèrent plutôt que d'autres phénotypes du mutant *topA* et/ou des mutants hélicases sont en jeu. Dans les trois prochaines sections, nous tenterons d'expliquer nos résultats dans ce contexte.

L'absence de l'hélicase Rep améliore la croissance du mutant *topA gyrB*(Ts) aux basses températures (non-permissives)

Le mutant *topA gyrB*(Ts) montre plus de difficultés de croissance par rapport à une souche isogénique *topA*⁺ au fur et à mesure que la température est abaissée (Drolet *et al.*, 1995), d'abord à cause de la réactivation complète de la gyrase (à partir de 30°C), puis éventuellement à cause de l'inactivation de la topoisomérase IV (Baaklini *et al.*, 2008; Usongo *et al.*, 2008), autre enzyme qui relaxe l'ADN et principale décaténase cellulaire. La surproduction de la RNaseHI complémente bien à des températures intermédiaires, jusqu'à environ 27°C, puis éventuellement elle a un effet négatif (autour de 22°C) (Broccoli *et al.*, 2000; Drolet *et al.*, 1995). Nous avons récemment isolé des supresseurs extragéniques, par transposons, qui permettent la croissance de notre mutant *topA* à des températures auxquelles la surproduction de la RNaseHI ne complémente pas. Ces supresseurs affectent des gènes impliqués dans la réplication du chromosome (Usongo et Drolet, manuscrit en révision, *PLoS Genetics*). Le meilleur de ces supresseurs est une insertion au milieu de la séquence *oriC*, l'origine de réplication du chromosome d'*E. coli*.

Cette mutation a pour effet de diminuer la réplication à un niveau tel qu'elle n'est pas viable dans des souches *topA*⁺. Ces résultats nous ont permis de conclure qu'une fonction majeure de la topoisomérase I à basses températures, est d'empêcher la sur-réplication à partir de *oriC* qui, autrement, aurait pour effet de causer un trop grand nombre de fourches de réplication convergentes dans la région *ter* (terminaison de la réplication). Dans de telles conditions, il y aurait hyper-recombinaison et inhibition de la ségrégation des chromosomes.

L'effet positif de la délétion *rep* observée dans ce travail, pourrait très bien s'expliquer dans ce contexte. En effet, l'absence de l'hélicase Rep aurait pour effet de ralentir la réplication, ce qui aiderait la croissance du mutant *topA*. De plus, ce résultat supporterait notre hypothèse que l'effet négatif de la surproduction de la RNaseHI dans notre mutant *topA* à basses températures, s'expliquerait par une stimulation de la réplication suite à l'élimination de R-loops, qui ralentissent la réplication. Cependant, dans ce contexte, il est plutôt difficile d'expliquer l'augmentation de cet effet négatif de la RNaseHI suite à la délétion de l'hélicase Rep, tel qu'observé dans ce travail.

Peut-être alors que la stimulation de la réplication par la surproduction de la RNaseHI (élimination des R-loops) cause un trop grand nombre de collisions avec des obstacles laissés en plan suite à la délétion de l'hélicase Rep.

À l'opposé, l'effet négatif de cette délétion *rep* dans le mutant *gyrB(Ts)* à 37°C, s'expliquerait par la présence d'une gyrase affaiblie qui supporte déjà mal la progression des fourches de réplication. L'absence de Rep augmenterait d'avantage ce problème.

L'inactivation de l'hélicase UvrD affecte négativement la croissance du mutant *topA* mais pas celle de la souche *gyrB(Ts)*.

Les résultats obtenus ici montrent que l'absence de l'hélicase UvrD entraîne plus de difficultés de croissance du mutant *topA* aux basses températures (24 et 30°C) que la RNaseHI soit surproduite ou non. Ces résultats indiquent que les R-loops ne sont pas responsables du faible taux de croissance du mutant *topAΔuvrD::km*. Les défauts de croissance de ce mutant sont aussi accompagnés de problèmes de ségrégation des chromosomes illustrés ici par la filamentation cellulaire et l'accumulation de masses d'ADN non séparées.

Une fonction bien établie de UvrD est le déplacement de RecA sur l'ADN simple brin, empêchant ainsi la recombinaison homologue RecA-dépendante (Centore *et al.*, 2007). Nous avons récemment montré que la délétion de *recA* du mutant *topA* améliorerait nettement la croissance de ce dernier de même que la ségrégation des chromosomes (Usongo et Drolet, manuscrit en révision, *PLoS Genetics*). Dans ce contexte, il est clair que l'absence de UvrD causerait un aggravement des problèmes de croissance du mutant *topA* liés à l'hyper-recombinaison et à la ségrégation des chromosomes, problèmes qui sont indépendants des R-loops.

L'inactivation de l'hélicase DinG n'affecte pas la croissance du mutant *topA*.

Parmi les trois hélicases étudiées ici, DinG est la moins bien caractérisée au niveau de ses fonctions possibles *in vivo*. Les résultats d'une étude récente suggèrent que l'hélicase DinG pourrait enlever des R-loops. En effet, des phénotypes associés à l'inversion des opérons *rrn* dans une souche dépourvue de DinG pouvaient être partiellement corrigés par la surproduction de la RNaseHI (Boubakri *et al.*, 2010). Dans ce contexte, et si l'hélicase DinG joue un rôle important dans l'élimination des R-loops, nous avons émis comme hypothèse que l'absence de cette hélicase entraînerait plus de difficultés de croissance du mutant *topA*. Toutefois, nos résultats montrent qu'il n'en est rien, puisque le mutant *topAΔdinG::km* pousse aussi bien que le mutant *topA* et que la surproduction de la RNaseHI a un effet positif identique sur la croissance de ces deux souches.

Il ne semble donc pas que l'hélicase DinG joue un rôle significatif dans l'élimination des R-loops, à tout le moins dans le mutant *topA*. Il est à noter que dans l'étude de Boubakri et al. (2010), les opérons *rrn* devaient être inversés dans le mutant *dinG* afin que l'effet bénéfique de la surproduction de la RNaseHI sur la croissance, puisse être observé.

De même, dans cette étude, des phénotypes liés à des ARN polymérase bloquées n'étaient observés que lorsque DinG était absente en même temps que Rep ou UvrD. Ces résultats suggèrent que DinG joue un rôle plutôt mineur dans l'élimination des obstacles à la réplication, tels que les ARN polymérase et les R-loops. Dans cette étude, l'hélicase Rep était nettement la plus importante pour éliminer ces obstacles.

Nos résultats de microscopie montre un effet positif de l'absence de DinG sur la ségrégation des chromosomes dans le mutant *topA*. Rep a aussi un effet positif à ce niveau mais, contrairement à DinG, elle corrige également les défauts de croissance. Ces résultats supportent l'hypothèse que Rep est une meilleure hélicase pour enlever des obstacles à la réplication que DinG. Rappelons que dans le contexte du mutant *topA*, une telle activité aurait possiblement un effet néfaste en augmentant le taux de réplication et, en conséquence, l'hyper-recombinaison et les problèmes de ségrégation des chromosomes.

5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les résultats obtenus lors de cette étude peuvent être expliqués dans le contexte d'une fonction majeure de la topoisomérase I, révélée dans notre laboratoire (Usongo et Drolet, en révision pour *PLoS Genetics*), soit le contrôle de l'initiation de la réplication à partir de *oriC*. L'absence d'un tel contrôle entraîne un défaut de ségrégation des chromosomes, associé à l'hyper-recombinaison, qui cause l'inhibition de la croissance (Usongo et Drolet, en révision pour *PLoS Genetics*). Le lien entre la réplication et la recombinaison est présent chez tous les organismes vivants et lorsque la réplication n'est pas bien régulée cela peut entraîner de l'instabilité génomique et des cancers chez l'humain. Il est donc crucial de bien caractériser les mécanismes qui contrôlent la réplication à toutes ses étapes, soient l'initiation, l'élongation et la terminaison.

Les résultats obtenus ici mettent en lumière le rôle important de la topoisomérase I et du surenroulement de l'ADN sur l'initiation de la réplication, l'effet des hélicases Rep et DinG sur l'élongation et l'effet de UvrD dans la recombinaison liée à la sur-réplication.

Étant donné que ces trois hélicases peuvent avoir des effets redondants dans la cellule, il serait maintenant important de construire des souches *topA* simultanément déficientes pour deux de ces hélicases. De nouveaux phénotypes, certains peut-être reliés aux R-loops, pourraient être ainsi révélés. De même, il serait important d'utiliser la cytométrie en flux et le marquage pulsé de l'ADN, afin de mesurer le taux de réplication dans nos différents mutants

6. BIBLIOGRAPHIE

- Adams, D. E., Shekhtman, E. M., Zechiedrich, E. L., Schmid, M. B., & Cozzarelli, N. R. (1992). The role of topoisomerase IV in partitioning bacterial replicons and the structure of catenated intermediates in DNA replication. *Cell*, 71(2), 277-288.
- Avery, O. T., MacLeod, C. M., & McCarty, M. (1944). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of *pneumococcal* types: Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from *pneumococcus* type iii. *J Exp Med*, 79(2), 137-158.
- Baaklini, I., Usongo, V., Nolent, F., Sanscartier, P., Hraiky, C., Drlica, K., & Drolet, M. (2008). Hypernegative supercoiling inhibits growth by causing RNA degradation. *J Bacteriol*, 190(22), 7346-7356.
- Baharoglu, Z., Lestini, R., Duigou, S., & Michel, B. (2010). RNA polymerase mutations that facilitate replication progression in the *rep uvrD recF* mutant lacking two accessory replicative helicases. *Mol Microbiol*, 77(2), 324-336.
- Baker, N. M., Rajan, R., & Mondragon, A. (2009). Structural studies of type I topoisomerases. *Nucleic Acids Res*, 37(3), 693-701.
- Baranello, L., Levens, D., Gupta, A., & Kouzine, F. (2012). The importance of being supercoiled: how DNA mechanics regulate dynamic processes. *Biochim Biophys Acta*, 1819(7), 632-638.
- Bates, A. D., & Maxwell, A. (1993). DNA structure. Dans O. U. Press (dir.), *DNA topology* (p. 1-p.16). New York: IRL Press at Oxford University Press.

- Bedinger, P., Hochstrasser, M., Jongeneel, C. V., & Alberts, B. M. (1983). Properties of the T4 bacteriophage DNA replication apparatus: the T4 *dda* DNA helicase is required to pass a bound RNA polymerase molecule. *Cell*, 34(1), 115-123.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2002). DNA Can Assume a Variety of Structural Forms (*Biochemistry* (5th éd., p. p.746-p.750). New York: W. H. Freeman and CO.
- Bierne, H., Seigneur, M., Ehrlich, S. D., & Michel, B. (1997a). *UvrD* mutations enhance tandem repeat deletion in the *Escherichia coli* chromosome via SOS induction of the RecF recombination pathway. *Mol Microbiol*, 26(3), 557-567.
- Bierne, H., Vilette, D., Ehrlich, S. D., & Michel, B. (1997b). Isolation of a *dnaE* mutation which enhances RecA-independent homologous recombination in the *Escherichia coli* chromosome. *Mol Microbiol*, 24(6), 1225-1234.
- Bochman, M. L., Paeschke, K., & Zakian, V. A. (2012). DNA secondary structures: stability and function of G-quadruplex structures. *Nat Rev Genet*, 13(11), 770-780.
- Bockrath, R., Wolff, L., Farr, A., & Crouch, R. J. (1987). Amplified RNase H activity in *Escherichia coli* B/r increases sensitivity to ultraviolet radiation. *Genetics*, 115(1), 33-40.
- Boubakri, H., de Septenville, A. L., Viguera, E., & Michel, B. (2010). The helicases DinG, Rep and UvrD cooperate to promote replication across transcription units in vivo. *Embo J*, 29(1), 145-157.

- Bredeche, M. F., Ehrlich, S. D., & Michel, B. (2001). Viability of *rep recA* mutants depends on their capacity to cope with spontaneous oxidative damage and on the DnaK chaperone protein. *J Bacteriol*, *183*(7), 2165-2171.
- Britton, R. A., Lin, D. C., & Grossman, A. D. (1998). Characterization of a prokaryotic SMC protein involved in chromosome partitioning. *Genes Dev*, *12*(9), 1254-1259.
- Broccoli, S., Phoenix, P., & Drolet, M. (2000). Isolation of the *topB* gene encoding DNA topoisomerase III as a multicopy suppressor of *topA* null mutations in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, *35*(1), 58-68.
- Brown, P. O., Peebles, C. L., & Cozzarelli, N. R. (1979). A topoisomerase from *Escherichia coli* related to DNA gyrase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *76*(12), 6110-6114.
- Centore, R. C., & Sandler, S. J. (2007). UvrD limits the number and intensities of RecA-green fluorescent protein structures in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, *189*(7), 2915-2920.
- Champoux, J. J. (2001). DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem*, *70*, 369-413.
- Chen, D., Bowater, R., & Lilley, D. M. (1994). Topological promoter coupling in *Escherichia coli*: *delta topA*-dependent activation of the leu-500 promoter on a plasmid. *J Bacteriol*, *176*(12), 3757-3764.
- Cheng, B., Zhu, C. X., Ji, C., Ahumada, A., & Tse-Dinh, Y. C. (2003). Direct interaction between *Escherichia coli* RNA polymerase and the zinc ribbon domains of DNA topoisomerase I. *J Biol Chem*, *278*(33), 30705-30710.

- Courcelle, J., Khodursky, A., Peter, B., Brown, P. O., & Hanawalt, P. C. (2001). Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild-type and SOS-deficient *Escherichia coli*. *Genetics*, *158*(1), 41-64.
- De Septenville, A. L., Duigou, S., Boubakri, H., & Michel, B. (2012). Replication fork reversal after replication-transcription collision. *PLoS Genet*, *8*(4), e1002622.
- Denhardt, D. T., Dressler, D. H., & Hathaway, A. (1967). The abortive replication of phix174 DNA in a recombination-deficient mutant of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *57*(3), 813-820.
- Depew, R. E., Liu, L. F., & Wang, J. C. (1978). Interaction between DNA and *Escherichia coli* protein omega. Formation of a complex between single-stranded DNA and omega protein. *J Biol Chem*, *253*(2), 511-518.
- DiGate, R. J., & Marians, K. J. (1988). Identification of a potent decatenating enzyme from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, *263*(26), 13366-13373.
- DiGate, R. J., & Marians, K. J. (1989). Molecular cloning and DNA sequence analysis of *Escherichia coli topB*, the gene encoding topoisomerase III. *J Biol Chem*, *264*(30), 17924-17930.
- DiNardo, Voelkel, K. A., Sternglanz, R., Reynolds, A. E., & Wright, A. (1982). *Escherichia coli* DNA topoisomerase I mutants have compensatory mutations in DNA gyrase genes. *Cell*, *31*(1), 43-51.
- Drlica, K. (1984). Biology of bacterial deoxyribonucleic acid topoisomerases. *Microbiol Rev*, *48*(4), 273-289.
- Drlica, K. (1992). Control of bacterial DNA supercoiling. *Mol Microbiol*, *6*(4), 425-433.

- Drolet, M., Bi, X., & Liu, L. F. (1994). Hypernegative supercoiling of the DNA template during transcription elongation in vitro. *J Biol Chem*, 269(3), 2068-2074.
- Drolet, M., Phoenix, P., Menzel, R., Masse, E., Liu, L. F., & Crouch, R. J. (1995). Overexpression of RNase H partially complements the growth defect of an *Escherichia coli delta topA* mutant: R-loop formation is a major problem in the absence of DNA topoisomerase I. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(8), 3526-3530.
- Duguet, & J.-F., R. (1994). *De la topologie de l'ADN aux médicaments antibiotiques et anticancéreux*. EDK, Sèvres, FRANCE (1985) (Revue): EDK.
- Dulbecco, R., & Vogt, M. (1963). Evidence for a ring structure of polyoma virus DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 50, 236-243.
- Espeli, O., & Marians, K. J. (2004). Untangling intracellular DNA topology. *Mol Microbiol*, 52(4), 925-931.
- Fabrega, A., Madurga, S., Giralt, E., & Vila, J. (2009). Mechanism of action of and resistance to quinolones. *Microb Biotechnol*, 2(1), 40-61.
- Fishel, R. A., & Kolodner, R. (1984). *Escherichia coli* strains containing mutations in the structural gene for topoisomerase I are recombination deficient. *J Bacteriol*, 160(3), 1168-1170.
- Fleischmann, G., Pflugfelder, G., Steiner, E. K., Javaherian, K., Howard, G. C., Wang, J. C., & Elgin, S. C. (1984). *Drosophila* DNA topoisomerase I is associated with transcriptionally active regions of the genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81(22), 6958-6962.
- Flores, M. J., Bidnenko, V., & Michel, B. (2004). The DNA repair helicase UvrD is essential for replication fork reversal in replication mutants. *EMBO Rep*, 5(10), 983-988.

- Flores, M. J., Bierne, H., Ehrlich, S. D., & Michel, B. (2001). Impairment of lagging strand synthesis triggers the formation of a RuvABC substrate at replication forks. *Embo J*, 20(3), 619-629.
- Flores, M. J., Sanchez, N., & Michel, B. (2005). A fork-clearing role for UvrD. *Mol Microbiol*, 57(6), 1664-1675.
- Forterre, P., Gribaldo, S., Gabelle, D., & Serre, M. C. (2007). Origin and evolution of DNA topoisomerases. *Biochimie*, 89(4), 427-446.
- Frank-Kamenetskiĭ, M. D. (1996). De la physique à la Biologie modernes (*Le fil de la vie : la découverte de l'ADN* (p. p.11-p.29). Paris: Flammarion.
- Funnell, B. E., Baker, T. A., & Kornberg, A. (1986). Complete enzymatic replication of plasmids containing the origin of the *Escherichia coli* chromosome. *J Biol Chem*, 261(12), 5616-5624.
- Funnell, B. E., Baker, T. A., & Kornberg, A. (1987). In vitro assembly of a prepriming complex at the origin of the *Escherichia coli* chromosome. *J Biol Chem*, 262(21), 10327-10334.
- Gan, W., Guan, Z., Liu, J., Gui, T., Shen, K., Manley, J. L., & Li, X. (2011). R-loop-mediated genomic instability is caused by impairment of replication fork progression. *Genes Dev*, 25(19), 2041-2056.
- Garrett, R., & Grisham, C. M. (2000a). Structure des acides nucléiques (*Biochimie* (1re^e éd., p. 363-p.394). Paris: De Boeck Université.
- Garrett, R., & Grisham, C. M. (2000b). Transcription et régulation de l'expression des gènes (*Biochimie* (1re^e éd., p. 1016). Paris: De Boeck Université.
- Gellert, M., Mizuuchi, K., O'Dea, M. H., & Nash, H. A. (1976a). DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 73(11), 3872-3876.

- Gellert, M., O'Dea, M. H., Itoh, T., & Tomizawa, J. (1976b). Novobiocin and coumermycin inhibit DNA supercoiling catalyzed by DNA gyrase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 73(12), 4474-4478.
- Goss, W. A., Deitz, W. H., & Cook, T. M. (1964). Mechanism of action of nalidixic acid on *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 88, 1112-1118.
- Hammond, G. G., Cassidy, P. J., & Overbye, K. M. (1991). Novobiocin-dependent *topA* deletion mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 173(17), 5564-5567.
- Handa, N., Morimatsu, K., Lovett, S. T., & Kowalczykowski, S. C. (2009). Reconstitution of initial steps of dsDNA break repair by the RecF pathway of *E. coli*. *Genes Dev*, 23(10), 1234-1245.
- Harmon, F. G., Brockman, J. P., & Kowalczykowski, S. C. (2003). RecQ helicase stimulates both DNA catenation and changes in DNA topology by topoisomerase III. *J Biol Chem*, 278(43), 42668-42678.
- Harmon, F. G., DiGate, R. J., & Kowalczykowski, S. C. (1999). RecQ helicase and topoisomerase III comprise a novel DNA strand passage function: a conserved mechanism for control of DNA recombination. *Mol Cell*, 3(5), 611-620.
- Hiasa, H., & Marians, K. J. (1994). Topoisomerase III, but not topoisomerase I, can support nascent chain elongation during theta-type DNA replication. *J Biol Chem*, 269(51), 32655-32659.
- Hiasa, H., & Shea, M. E. (2000). DNA gyrase-mediated wrapping of the DNA strand is required for the replication fork arrest by the DNA gyrase-quinolone-DNA ternary complex. *J Biol Chem*, 275(44), 34780-34786.

- Itaya, M. (1990). Isolation and characterization of a second RNase H (RNase HII) of *Escherichia coli* K-12 encoded by the *rnhB* gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(21), 8587-8591.
- Jovanovich, S. B., & Lebowitz, J. (1987). Estimation of the effect of coumermycin A1 on *Salmonella typhimurium* promoters by using random operon fusions. *J Bacteriol*, 169(10), 4431-4435.
- Kampranis, S. C., & Maxwell, A. (1996). Conversion of DNA gyrase into a conventional type II topoisomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(25), 14416-14421.
- Kanaya, S., & Crouch, R. J. (1983). DNA sequence of the gene coding for *Escherichia coli* ribonuclease H. *J Biol Chem*, 258(2), 1276-1281.
- Kato, J., Nishimura, Y., Imamura, R., Niki, H., Hiraga, S., & Suzuki, H. (1990). New topoisomerase essential for chromosome segregation in *E. coli*. *Cell*, 63(2), 393-404.
- Kato, J., Suzuki, H., & Ikeda, H. (1992). Purification and characterization of DNA topoisomerase IV in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 267(36), 25676-25684.
- Khodursky, A. B., Zechiedrich, E. L., & Cozzarelli, N. R. (1995). Topoisomerase IV is a target of quinolones in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(25), 11801-11805.
- Kline, K. A., & Seifert, H. S. (2005). Role of the Rep helicase gene in homologous recombination in *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol*, 187(8), 2903-2907.
- Kogoma, T., Cadwell, G. W., Barnard, K. G., & Asai, T. (1996). The DNA replication priming protein, PriA, is required for homologous recombination and double-strand break repair. *J Bacteriol*, 178(5), 1258-1264.

- Koonin, E. V. (1993). *Escherichia coli* *dinG* gene encodes a putative DNA helicase related to a group of eukaryotic helicases including Rad3 protein. *Nucleic Acids Res*, 21(6), 1497.
- Kreuzer, K. N., & Cozzarelli, N. R. (1979). *Escherichia coli* mutants thermosensitive for deoxyribonucleic acid gyrase subunit A: effects on deoxyribonucleic acid replication, transcription, and bacteriophage growth. *J Bacteriol*, 140(2), 424-435.
- Kubitschek, H. E., & Freedman, M. L. (1971). Chromosome replication and the division cycle of *Escherichia coli* B-r. *J Bacteriol*, 107(1), 95-99.
- Kumagai, Y., Kato, J. I., Hoshino, K., Akasaka, T., Sato, K., & Ikeda, H. (1996). Quinolone-resistant mutants of *Escherichia coli* DNA topoisomerase IV *parC* gene. *Antimicrob Agents Chemother*, 40(3), 710-714.
- Lane, H. E., & Denhardt, D. T. (1974). The *rep* mutation. III. Altered structure of the replicating *Escherichia coli* chromosome. *J Bacteriol*, 120(2), 805-814.
- Lecoite, F., Serena, C., Velten, M., Costes, A., McGovern, S., Meile, J. C., Errington, J., Ehrlich, S. D., Noirot, P., & Polard, P. (2007). Anticipating chromosomal replication fork arrest: SSB targets repair DNA helicases to active forks. *Embo J*, 26(19), 4239-4251.
- Lestini, R., & Michel, B. (2007). UvrD controls the access of recombination proteins to blocked replication forks. *Embo J*, 26(16), 3804-3814.
- Lestini, R., & Michel, B. (2008). UvrD and UvrD252 counteract RecQ, RecJ, and RecFOR in a *rep* mutant of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 190(17), 5995-6001.

- Lewis, L. K., Jenkins, M. E., & Mount, D. W. (1992). Isolation of DNA damage-inducible promoters in *Escherichia coli*: regulation of *polB* (*dinA*), *dinG*, and *dinH* by LexA repressor. *J Bacteriol*, *174*(10), 3377-3385.
- Li, X., & Manley, J. L. (2006). Cotranscriptional processes and their influence on genome stability. *Genes Dev*, *20*(14), 1838-1847.
- Liu, H., Rudolf, J., Johnson, K. A., McMahon, S. A., Oke, M., Carter, L., McRobbie, A. M., Brown, S. E., Naismith, J. H., & White, M. F. (2008). Structure of the DNA repair helicase XPD. *Cell*, *133*(5), 801-812.
- Liu, L. F., Liu, C. C., & Alberts, B. M. (1980). Type II DNA topoisomerases: enzymes that can unknot a topologically knotted DNA molecule via a reversible double-strand break. *Cell*, *19*(3), 697-707.
- Liu, L. F., & Wang, J. C. (1987). Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *84*(20), 7024-7027.
- Lodish, H. F. (1997). Acides nucléiques, code génétique et synthèse des protéines (*Biologie moléculaire de la cellule* (1re éd.^e éd., p. pp. 101-111). Bruxelles: De Boeck.
- Lopez, C. R., Yang, S., Deibler, R. W., Ray, S. A., Pennington, J. M., Digate, R. J., Hastings, P. J., Rosenberg, S. M., & Zechiedrich, E. L. (2005). A role for topoisomerase III in a recombination pathway alternative to RuvABC. *Mol Microbiol*, *58*(1), 80-101.
- Luttinger, A. L., Springer, A. L., & Schmid, M. B. (1991). A cluster of genes that affects nucleoid segregation in *Salmonella typhimurium*. *New Biol*, *3*(7), 687-697.

- Maluf, N. K., Ali, J. A., & Lohman, T. M. (2003). Kinetic mechanism for formation of the active, dimeric UvrD helicase-DNA complex. *J Biol Chem*, 278(34), 31930-31940.
- Martinez-Robles, M. L., Witz, G., Hernandez, P., Schwartzman, J. B., Stasiak, A., & Krimer, D. B. (2009). Interplay of DNA supercoiling and catenation during the segregation of sister duplexes. *Nucleic Acids Res*, 37(15), 5126-5137.
- Massé, E., & Drolet, M. (1999). *Escherichia coli* DNA topoisomerase I inhibits R-loop formation by relaxing transcription-induced negative supercoiling. *J Biol Chem*, 274(23), 16659-16664.
- Matson, S. W. (1989). *Escherichia coli* DNA helicase II (*uvrD* gene product) catalyzes the unwinding of DNA-RNA hybrids in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(12), 4430-4434.
- McRobbie, A. M., Meyer, B., Rouillon, C., Petrovic-Stojanovska, B., Liu, H., & White, M. F. (2012). *Staphylococcus aureus* DinG, a helicase that has evolved into a nuclease. *Biochem J.*, 442(1), 77-84.
- Menzel, R., & Gellert, M. (1987). Modulation of transcription by DNA supercoiling: a deletion analysis of the *Escherichia coli* *gyrA* and *gyrB* promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(12), 4185-4189.
- Michel, B. (2000). Replication fork arrest and DNA recombination. *Trends Biochem Sci*, 25(4), 173-178.
- Michel, B., Boubakri, H., Baharoglu, Z., LeMasson, M., & Lestini, R. (2007). Recombination proteins and rescue of arrested replication forks. *DNA Repair (Amst)*, 6(7), 967-980.

- Michel, B., Flores, M. J., Viguera, E., Grompone, G., Seigneur, M., & Bidnenko, V. (2001). Rescue of arrested replication forks by homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(15), 8181-8188.
- Michel, B., Grompone, G., Flores, M. J., & Bidnenko, V. (2004). Multiple pathways process stalled replication forks. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(35), 12783-12788.
- Mizuuchi, K., Fisher, L. M., O'Dea, M. H., & Gellert, M. (1980). DNA gyrase action involves the introduction of transient double-strand breaks into DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77(4), 1847-1851.
- Muller, M. T., Pfund, W. P., Mehta, V. B., & Trask, D. K. (1985). Eukaryotic type I topoisomerase is enriched in the nucleolus and catalytically active on ribosomal DNA. *Embo J*, 4(5), 1237-1243.
- Nurse, P., Levine, C., Hassing, H., & Marians, K. J. (2003). Topoisomerase III can serve as the cellular decatenase in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 278(10), 8653-8660.
- O'Donnell, M. (2006). Replisome architecture and dynamics in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 281(16), 10653-10656.
- O'Reilly, E. K., & Kreuzer, K. N. (2004). Isolation of SOS constitutive mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 186(21), 7149-7160.
- Orren, D. K., Selby, C. P., Hearst, J. E., & Sancar, A. (1992). Post-incision steps of nucleotide excision repair in *Escherichia coli*. Disassembly of the UvrBC-DNA complex by helicase II and DNA polymerase I. *J Biol Chem*, 267(2), 780-788.
- Ossanna, N., & Mount, D. W. (1989). Mutations in *uvrD* induce the SOS response in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 171(1), 303-307.

- Peng, H., & Marians, K. J. (1993a). Decatenation activity of topoisomerase IV during oriC and pBR322 DNA replication in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(18), 8571-8575.
- Peng, H., & Marians, K. J. (1993b). *Escherichia coli* topoisomerase IV. Purification, characterization, subunit structure, and subunit interactions. *J Biol Chem*, 268(32), 24481-24490.
- Peter, B. J., Ullsperger, C., Hiasa, H., Marians, K. J., & Cozzarelli, N. R. (1998). The structure of supercoiled intermediates in DNA replication. *Cell*, 94(6), 819-827.
- Petit, M. A., & Ehrlich, D. (2002). Essential bacterial helicases that counteract the toxicity of recombination proteins. *Embo J*, 21(12), 3137-3147.
- Phoenix, P., Raymond, M. A., Masse, E., & Drolet, M. (1997). Roles of DNA topoisomerases in the regulation of R-loop formation in vitro. *J Biol Chem*, 272(3), 1473-1479.
- Pray, L. (2008). Discovery of DNA structure and function: Watson and Crick. *Nature Education*, 1(1).
- Pruss, G. J., & Drlica, K. (1986). Topoisomerase I mutants: the gene on pBR322 that encodes resistance to tetracycline affects plasmid DNA supercoiling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(23), 8952-8956.
- Pruss, G. J., & Drlica, K. (1989). DNA supercoiling and prokaryotic transcription. *Cell*, 56(4), 521-523.
- Pruss, G. J., Manes, S. H., & Drlica, K. (1982). *Escherichia coli* DNA topoisomerase I mutants: increased supercoiling is corrected by mutations near gyrase genes. *Cell*, 31(1), 35-42.

- Rampakakis, E., Gkogkas, C., Di Paola, D., & Zannis-Hadjopoulos, M. (2010). Replication initiation and DNA topology: The twisted life of the origin. *J Cell Biochem*, *110*(1), 35-43.
- Ren, B., Duan, X., & Ding, H. (2009). Redox control of the DNA damage-inducible protein DinG helicase activity via its iron-sulfur cluster. *J Biol Chem*, *284*(8), 4829-4835.
- Rudolf, J., Makrantonis, V., Ingledew, W. J., Stark, M. J., & White, M. F. (2006). The DNA repair helicases XPD and FancJ have essential iron-sulfur domains. *Mol Cell*, *23*(6), 801-808.
- Sandler, S. J. (2000). Multiple genetic pathways for restarting DNA replication forks in *Escherichia coli* K-12. *Genetics*, *155*(2), 487-497.
- Sandler, S. J., & Marians, K. J. (2000). Role of PriA in replication fork reactivation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, *182*(1), 9-13.
- Sandler, S. J., Samra, H. S., & Clark, A. J. (1996). Differential suppression of *priA2::kan* phenotypes in *Escherichia coli* K-12 by mutations in *priA*, *lexA*, and *dnaC*. *Genetics*, *143*(1), 5-13.
- Schmid, M. B. (1990). A locus affecting nucleoid segregation in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol*, *172*(9), 5416-5424.
- Schofield, M. A., Agbunag, R., Michaels, M. L., & Miller, J. H. (1992). Cloning and sequencing of *Escherichia coli* *mutR* shows its identity to *topB*, encoding topoisomerase III. *J Bacteriol*, *174*(15), 5168-5170.
- Snyder, L., Peters, J. E., Henkin, T. M., & Champness, W. (2013). The Bacterial chromosome: DNA structure, Replication and Segregation. Dans A. Press (dir.), *Molecular genetics of bacteria* (4th^e éd., p. p.13-p.49). Washington, D.C.: ASM Press.

- Springer, A. L., & Schmid, M. B. (1993). Molecular characterization of the *Salmonella typhimurium parE* gene. *Nucleic Acids Res*, 21(8), 1805-1809.
- Steck, T. R., & Drlica, K. (1984). Bacterial chromosome segregation: evidence for DNA gyrase involvement in decatenation. *Cell*, 36(4), 1081-1088.
- Sternglanz, R., DiNardo, S., Voelkel, K. A., Nishimura, Y., Hirota, Y., Becherer, K., Zumstein, L., & Wang, J. C. (1981). Mutations in the gene coding for *Escherichia coli* DNA topoisomerase I affect transcription and transposition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78(5), 2747-2751.
- Stupina, V. A., & Wang, J. C. (2005). Viability of *Escherichia coli topA* mutants lacking DNA topoisomerase I. *J Biol Chem*, 280(1), 355-360.
- Sugino, A., Higgins, N. P., Brown, P. O., Peebles, C. L., & Cozzarelli, N. R. (1978). Energy coupling in DNA gyrase and the mechanism of action of novobiocin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 75(10), 4838-4842.
- Terekhova, K., Gunn, K. H., Marko, J. F., & Mondragon, A. (2012). Bacterial topoisomerase I and topoisomerase III relax supercoiled DNA via distinct pathways. *Nucleic Acids Res*, 40(20), 10432-10440.
- Tomko, E. J., Jia, H., Park, J., Maluf, N. K., Ha, T., & Lohman, T. M. (2010). 5'-Single-stranded/duplex DNA junctions are loading sites for *E. coli* UvrD translocase. *Embo J*, 29(22), 3826-3839.
- Travers, A., & Muskhelishvili, G. (2007). A common topology for bacterial and eukaryotic transcription initiation? *EMBO Rep*, 8(2), 147-151.
- Trucksis, M., & Depew, R. E. (1981). Identification and localization of a gene that specifies production of *Escherichia coli* DNA topoisomerase I. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78(4), 2164-2168.

- Tse, Y., & Wang, J. C. (1980). *E. coli* and *M. luteus* DNA topoisomerase I can catalyze catenation of decatenation of double-stranded DNA rings. *Cell*, 22(1 Pt 1), 269-276.
- Usongo, V., Nolent, F., Sanscartier, P., Tanguay, C., Broccoli, S., Baaklini, I., Drlica, K., & Drolet, M. (2008). Depletion of RNase HI activity in *Escherichia coli* lacking DNA topoisomerase I leads to defects in DNA supercoiling and segregation. *Mol Microbiol*, 69(4), 968-981.
- Uzest, M., Ehrlich, S. D., & Michel, B. (1995). Lethality of *rep recB* and *rep recC* double mutants of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 17(6), 1177-1188.
- Valenti, A., Perugino, G., Rossi, M., & Ciaramella, M. (2011). Positive supercoiling in thermophiles and mesophiles: of the good and evil. *Biochem Soc Trans*, 39(1), 58-63.
- Veaute, X., Delmas, S., Selva, M., Jeusset, J., Le Cam, E., Matic, I., Fabre, F., & Petit, M. A. (2005). UvrD helicase, unlike Rep helicase, dismantles RecA nucleoprotein filaments in *Escherichia coli*. *Embo J*, 24(1), 180-189.
- Viard, T., Cossard, R., Duguet, M., & de La Tour, C. B. (2004). Thermotoga maritima-*Escherichia coli* chimeric topoisomerases. Answers about involvement of the carboxyl-terminal domain in DNA topoisomerase I-mediated catalysis. *J Biol Chem*, 279(29), 30073-30080.
- Vilette, D., Ehrlich, S. D., & Michel, B. (1995). Transcription-induced deletions in *Escherichia coli* plasmids. *Mol Microbiol*, 17(3), 493-504.
- Vilette, D., Uzest, M., Ehrlich, S. D., & Michel, B. (1992). DNA transcription and repressor binding affect deletion formation in *Escherichia coli* plasmids. *Embo J*, 11(10), 3629-3634.

- Vinograd, J., & Lebowitz, J. (1966). Physical and topological properties of circular DNA. *J Gen Physiol*, 49(6), 103-125.
- Vinograd, J., Lebowitz, J., Radloff, R., Watson, R., & Laipis, P. (1965). The twisted circular form of polyoma viral DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 53(5), 1104-1111.
- Vologodskii, A., & Cozzarelli, N. R. (1996). Effect of supercoiling on the juxtaposition and relative orientation of DNA sites. *Biophys J.*, 70(6), 2548-2556.
- Voloshin, O. N., & Camerini-Otero, R. D. (2007). The DinG protein from *Escherichia coli* is a structure-specific helicase. *J Biol Chem*, 282(25), 18437-18447.
- Voloshin, O. N., Vanevski, F., Khil, P. P., & Camerini-Otero, R. D. (2003). Characterization of the DNA damage-inducible helicase DinG from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 278(30), 28284-28293.
- Wang, J. C. (1996). DNA topoisomerases. *Annu Rev Biochem*, 65, 635-692.
- Wang, X., Llopis, P. M., & Rudner, D. Z. (2013). Organization and segregation of bacterial chromosomes. *Nat Rev Genet*, 14(3), 191-203.
- Watson, J. D., & Crick, F. H. (1953). Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171(4356), 737-738.
- Weil, R., & Vinograd, J. (1963). The cyclic helix and cyclic coil forms of polyoma viral DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 50, 730-738.
- Wing, R., Drew, H., Takano, T., Broka, C., Tanaka, S., Itakura, K., & Dickerson, R. E. (1980). Crystal structure analysis of a complete turn of B-DNA. *Nature*, 287(5784), 755-758.
- Witz, G., & Stasiak, A. (2010). DNA supercoiling and its role in DNA decatenation and unknotting. *Nucleic Acids Res*, 38(7), 2119-2133.

- Worcel, A., Strogatz, S., & Riley, D. (1981). Structure of chromatin and the linking number of DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78(3), 1461-1465.
- Zechiedrich, E. L., & Cozzarelli, N. R. (1995). Roles of topoisomerase IV and DNA gyrase in DNA unlinking during replication in *Escherichia coli*. *Genes Dev*, 9(22), 2859-2869.
- Zechiedrich, E. L., Khodursky, A. B., Bachellier, S., Schneider, R., Chen, D., Lilley, D. M., & Cozzarelli, N. R. (2000). Roles of topoisomerases in maintaining steady-state DNA supercoiling in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 275(11), 8103-8113.
- Zechiedrich, E. L., Khodursky, A. B., & Cozzarelli, N. R. (1997). Topoisomerase IV, not gyrase, decatenates products of site-specific recombination in *Escherichia coli*. *Genes Dev*, 11(19), 2580-2592.
- Zhao, J., Bacolla, A., Wang, G., & Vasquez, K. M. (2010). Non-B DNA structure-induced genetic instability and evolution. *Cell Mol Life Sci*, 67(1), 43-62.
- Zhu, Q., Pongpech, P., & DiGate, R. J. (2001). Type I topoisomerase activity is required for proper chromosomal segregation in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(17), 9766-9771.
- Zieg, J., Maples, V. F., & Kushner, S. R. (1978). Recombinant levels of *Escherichia coli* K-12 mutants deficient in various replication, recombination, or repair genes. *J Bacteriol*, 134(3), 958-966.

7. ANNEXE

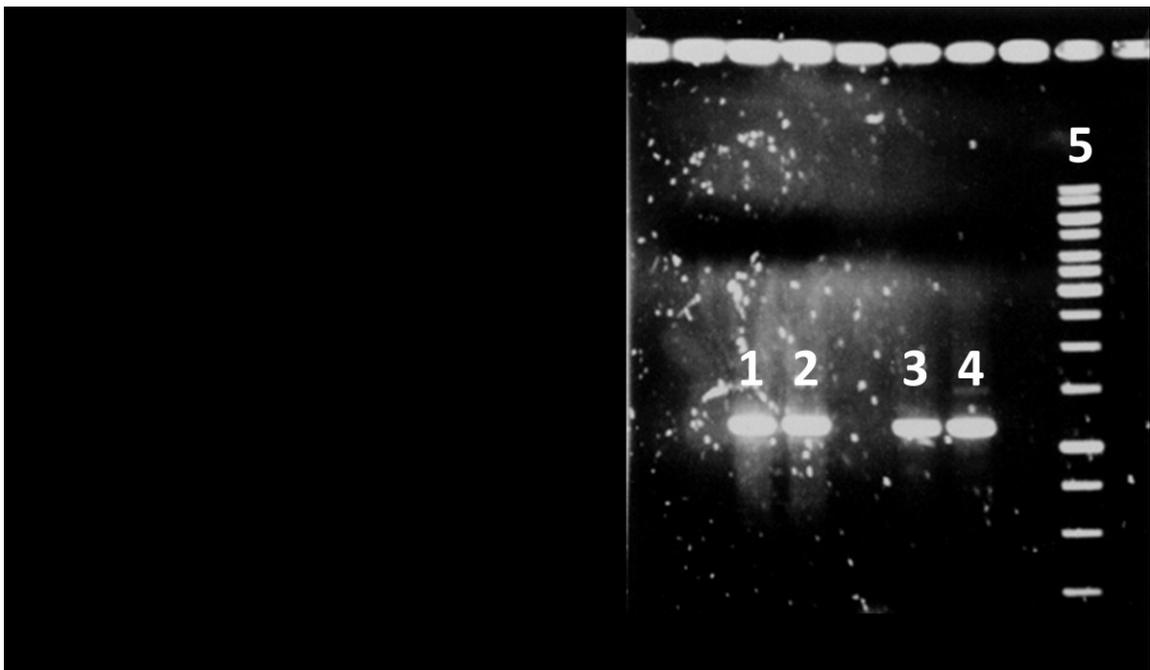
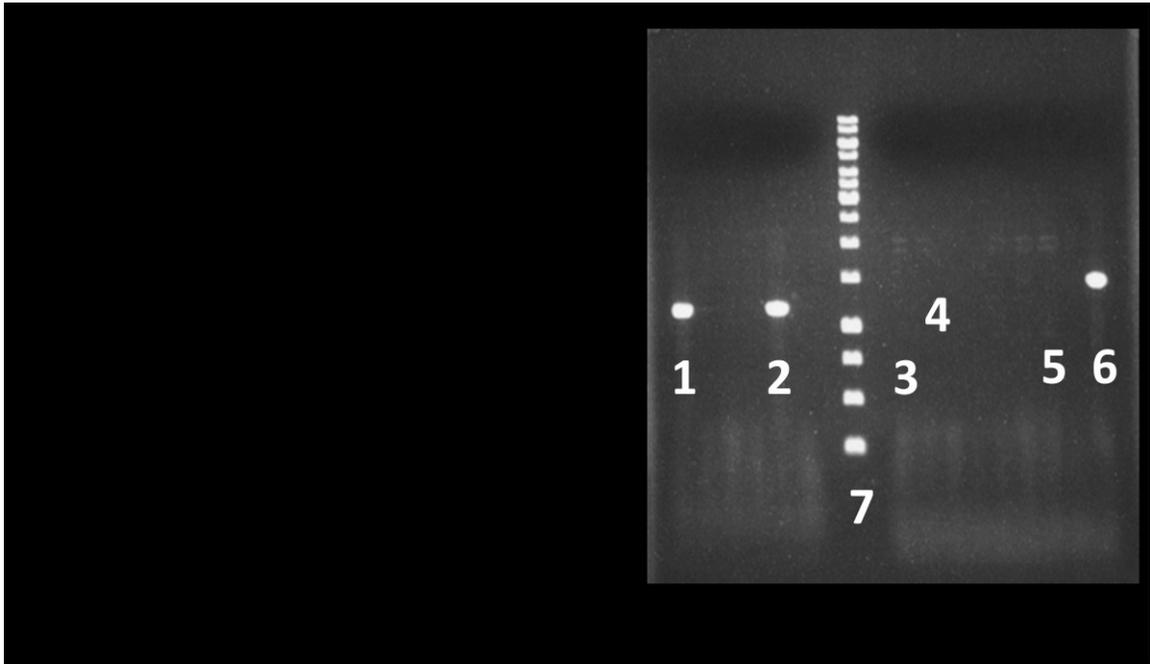


Figure 18 : PCR pour la vérification et la confirmation de l'inactivation du gène Rep chez les doubles mutants *topAΔrep::km* et *gyrB(Ts)Δrep::km* obtenus par transduction sur milieu pauvre VBcasa. La première confirmation PCR réalisée avec les amorces REP1 et KT1 sur les souches NC 183 (*topAΔrep::km*), NC 184 (*topAΔrep::km*) et NC 204 (*gyrB(Ts)Δrep::km*) est présenté sur la **figure 18.A** (point 1 pour NC 184) et sur la **figure 18.B** (point 1 pour NC 183 et point 2 pour NC 204). La souche JW 5604 (*Δrep::km*) sert de contrôle. La seconde confirmation PCR est réalisée avec les amorces TOPA1 et TOPA2 uniquement sur les souches dérivées du mutant *topA*. Les bandes de confirmation sont présentées sur la **figure 18.A** (point 3 pour NC 183 et point 3 pour NC 184). Les souches contrôles sont RFM 443 et RFM 475.

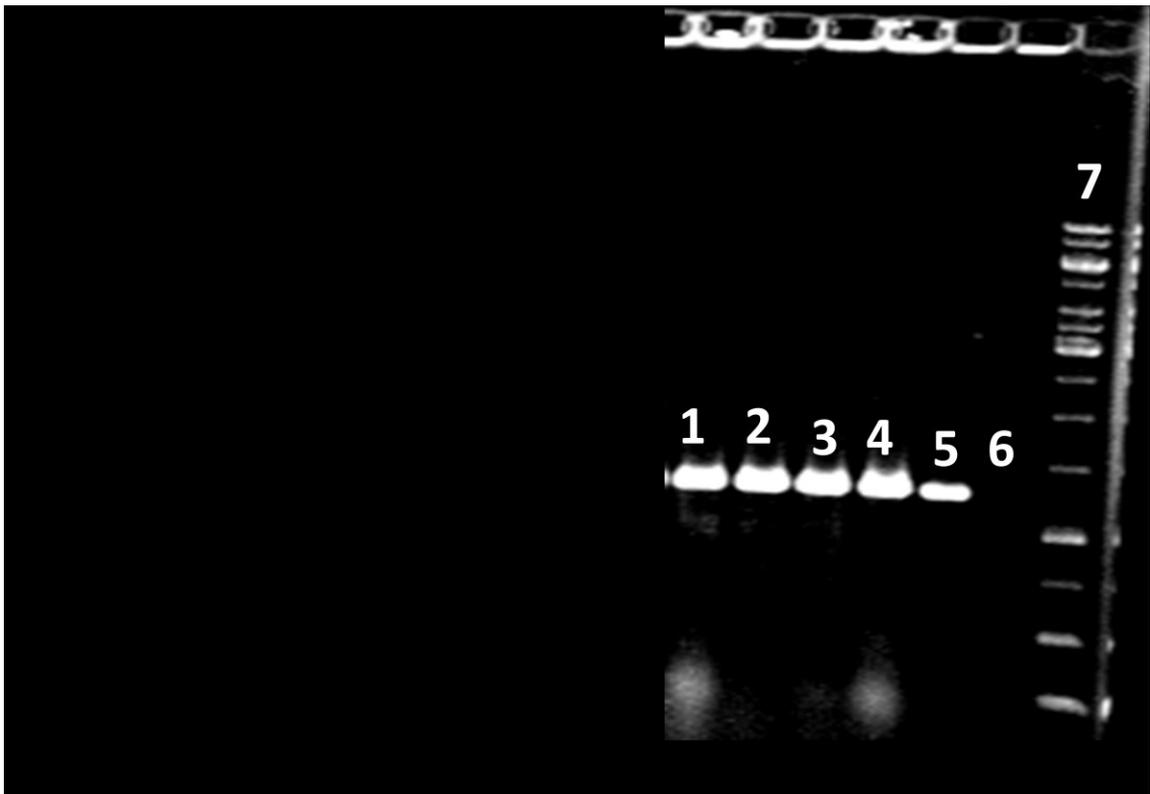
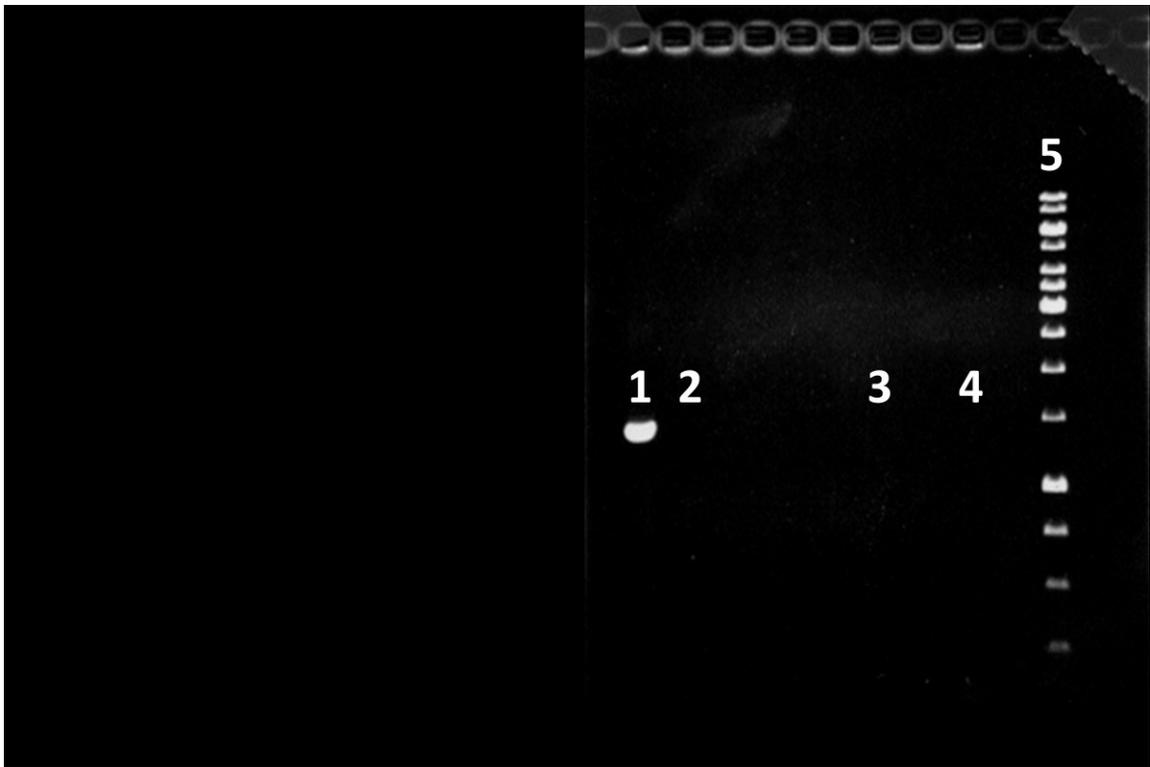


Figure 19 : PCR pour la vérification et la confirmation de l'inactivation du gène DinG chez les doubles mutants *topAΔdinG ::km*, *gyrB(Ts)Δrep ::km* et RFM 443ΔdinG ::km obtenus par transduction sur milieu pauvre VBcasa. La première confirmation PCR réalisée avec les amorces DinG1 et KT1 sur les souches NC 248 (*topAΔdinG ::km*), NC 253 (*topAΔdinG ::km*), NC 216 (*gyrB(Ts)ΔdinG ::km*) et NC 210 (*RFM 443ΔdinG ::km*) est présenté sur la **figure 19.B**. Les souches JW 0784 (*ΔdinG ::km*) et RFM 443 servent respectivement de contrôle positif et négatif. La seconde confirmation PCR est réalisée avec les amorces TOPA1 et TOPA2 uniquement sur les souches dérivées du mutant *topa*. Les bandes de confirmation sont présentées sur la **figure 19.A**. Les souches contrôles pour la bande TopA sont RFM 443 (contrôle positif) et RFM 475 (contrôle négatif).

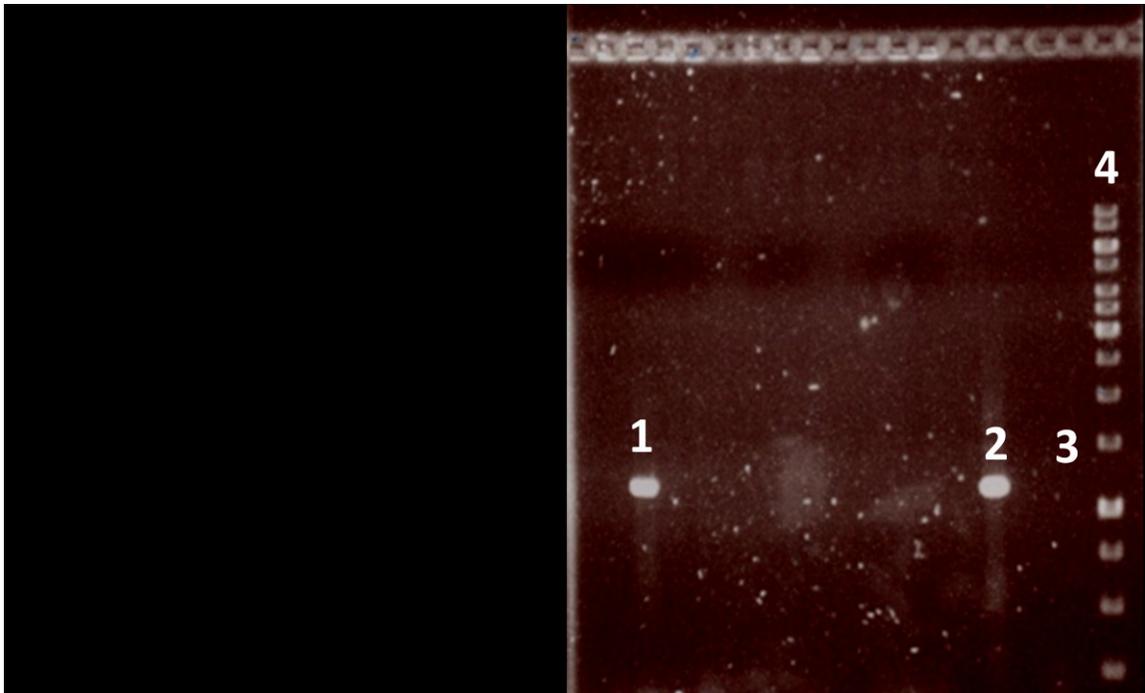


Figure 20 : PCR pour la vérification et la confirmation de l'inactivation du gène *UvrD* chez le double mutant *topAΔuvrD ::km* (NC 188) obtenus par transduction sur milieu pauvre VBcasa. La confirmation PCR est réalisée avec les amorces UVRD1 et KT1 sur la souche NC 188 (*topAΔuvrD ::km*). Les souches JW 3786 (*ΔuvrD ::km*) et RFM 443 servent respectivement de contrôle positif et négatif.